

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung der
Ludwig- Maximilians-Universität München
Klinikum Großhadern

Direktor emeritus
Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. K. Meßmer

**Die Wirkung von C-Peptid
auf die Wundheilung diabetischer Mäuse**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der
Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

**vorgelegt von Fenna Born
aus Bad Homburg v. d. H.**

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. K. Meßmer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. Landgraf
Prof. Dr. W. Mutschler

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter: Dr. med. S. Langer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 04. März 2004

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	6
1.1	Einleitung	6
1.2	Die physiologische Wundheilung	7
1.3	Die diabetische Wunde	9
1.4	C-Peptid	11
1.5	Zielsetzung und Fragestellung	13
2	Material und Methodik	14
2.1	Struktur und Funktion von C-Peptid	14
2.1.1	Biochemischer Hintergrund	14
2.1.2	Physiologische Bedeutung von C-Peptid	15
2.2	Die haarlose Maus	19
2.2.1	Die haarlose Maus als Versuchstier	19
2.2.2	Das Ohr der haarlosen Maus	20
2.2.2.1	Die Gefäßarchitektur	21
2.3	Versuchsdurchführung	22
2.3.1	Haltung der Tiere	22
2.3.2	Induktion einer diabetischen Stoffwechsellage	22
2.3.3	Darstellung des Ohres	22
2.3.4	Injektionen	23
2.3.4.1	Injektion zur Erzielung einer diabetischen Stoffwechsellage	23
2.3.4.2	Injektion des Fluoreszenzmarkers	23
2.3.4.3	Subkutane Injektion von C-Peptid und PBS	23
2.3.5	Chirurgische Eingriffe	24
2.3.5.1	Wundsetzung	24

2.3.5.2	Narkose.....	26
2.4	Bildaufnahme und Verarbeitung.....	26
2.4.1	Die Intravitalmikroskopie	26
2.4.2	Fluoreszeinisothiozyanat-Dextran und Rhodamin 6 G als Fluoreszenzmarker.....	27
2.4.3	Das Auswertungssystem.....	28
2.4.4	Messung der mikrozirkulatorischen Parameter	28
2.4.5	Funktionelle Gefäßdichte	31
2.4.6	Gefäßdurchmesser	32
2.4.7	Erythrozytenflußgeschwindigkeit.....	32
2.4.8	Messung der Wundfläche	33
2.4.9	Messung der Endothelzellinteraktionen der Leukozyten	33
2.4.10	Messung der Extravasation.....	34
2.4.11	Messung der C-Peptid Konzentration im Plasma.....	34
2.5	Versuchsdesign.....	35
2.5.1	Versuchsgruppen	35
2.5.2	Versuchsprotokoll.....	35
2.6	Statistik.....	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Die Induktion des Diabetes mellitus	38
3.2	Die Injektion von C-Peptid.....	39
3.2.1	Die Entwicklung des Körpergewichtes	39
3.2.2	C-Peptid Konzentrationen im Plasma	40
3.3	Intravitalmikroskopische Untersuchungen.....	41
3.3.1	Beurteilung der Wundgröße	41
3.3.2	Die mikrozirkulatorischen Parameter	42

3.3.2.1	Durchmesser der Venolen	42
3.3.2.2	Durchmesser der Arteriolen	43
3.3.2.3	Mittlere venöse Erythrozytenflußgeschwindigkeit (VRBCV).....	44
3.3.2.4	Mittlere arterioläre Erythrozytenflußgeschwindigkeit (ARBCV)	45
3.3.2.5	Funktionelle Kapillardichte (FCD)	46
3.3.2.6	Venöse Extravasation des Plasmamarkers FITC-Dextran (MG 150000)	47
3.3.2.7	Arteriöläre Extravasation des Plasmamarkers FITC-Dextran (MG 150000)	48
3.3.2.8	Anzahl der adhärenen Leukozyten in den Venolen.....	49
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	50
4	Diskussion.....	51
4.1	Problemstellung.....	51
4.2	Material und Methodik.....	52
4.2.1	Diskussion des Modells.....	52
4.2.1.1	Das Ohr der haarlosen Maus als Wundheilungsmodell	54
4.2.2	Meßmethoden	54
4.2.2.1	Funktionelle Gefäßdichte	54
4.2.2.2	Gefäßdurchmesser	56
4.2.2.3	Erythrozytenflußgeschwindigkeit.....	56
4.2.2.4	Planimetrie der Wunde.....	56
4.2.3	Die Injektionen	57
4.3	Diskussion der Ergebnisse.....	57
4.3.1	Induktion des Diabetes mellitus.....	57
4.3.2	Wundheilung	58

4.3.3	Serum	58
4.3.4	Mikrozirkulation	58
4.3.5	Probleme des Modells.....	60
5	Zusammenfassung.....	62
6	Literaturverzeichnis	64
7	Lebenslauf.....	74
8	Danksagung	76

1 EINFÜHRUNG

1.1 EINLEITUNG

Sachgerechte Wundversorgung und Wundbehandlung sowie die Beherrschung ihrer Komplikationen bleibt nach wie vor die Basis der operativen Disziplinen in der Medizin. Die ständig wachsende Anzahl von älteren Patienten, von Patienten mit Stoffwechselstörungen und Medikamentenabusus, die Ausweitung von Operationsindikationen bis ins hohe Alter hinein sowie die Zunahme der Eingriffe mit Verwendung alloplastischen Materials machen es notwendig, dass der behandelnde Arzt mit den Bedingungen und Voraussetzungen für eine möglichst ungestörte Wundheilung und eine optimale Wundbehandlung Schritt hält.

Die Behandlung von Wunden ist so alt wie die Menschheit selbst. Relikte aus prähistorischen Zeiten, wie z.B. neolithische Funde trepanierter Schädel (1) ließen schon auf die frühe Geschichte der Chirurgie schließen. Die optimale Behandlung von Wunden war seitdem eine Herausforderung. Durch zahlreiche Behandlungsmethoden wie Tinkturen, Verbände und Salben, über deren Wirkprinzip nur wenig bekannt war, versuchte man die Heilung zum Optimum zu bringen (2).

Die Vorstellung zum komplexen Ablauf der Wundheilung hatte lange eher beschreibenden Charakter. Heute nimmt das Wissen über das Zusammenspiel zellulärer und biochemischer Prozesse, aber vor allem über die Bedeutung der Mikrozirkulation im Rahmen der Wundheilung stetig zu.

Die intakte Blutversorgung ist Voraussetzung für die Gewebsregeneration (3). Wunden in ischämischem Gewebe weisen eine besonders schlechte Heilungstendenz auf (4). Aber nicht nur die Ischämie, sondern auch eine gestörte Funktion der Mikrozirkulation können eine verzögerte Wundheilung verursachen (3). So stellen Wundheilungsstörungen eine der Hauptkomplikationen der diabetischen Stoffwechsellage dar. Neben der Beeinträchtigung der lokalen Infektabwehr, ist eine verminderte Migration und Proliferation von Endothelzellen und Fibroblasten sowie der damit einhergehenden Veränderungen des Wundmilieus hierfür maßgeblich

verantwortlich (5).

1.2 DIE PHYSIOLOGISCHE WUNDHEILUNG

Der Ablauf der physiologischen Wundheilung ist in Abb.1 schematisch dargestellt. Die Wundheilung wird in drei Phasen eingeteilt (6):

1. Exsudative Phase
2. Proliferative Phase
3. Reparative Phase

Diese Phasen gehen fließend ineinander über und sind von zahlreichen Faktoren wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Gewebsdurchblutung etc. abhängig.(7)

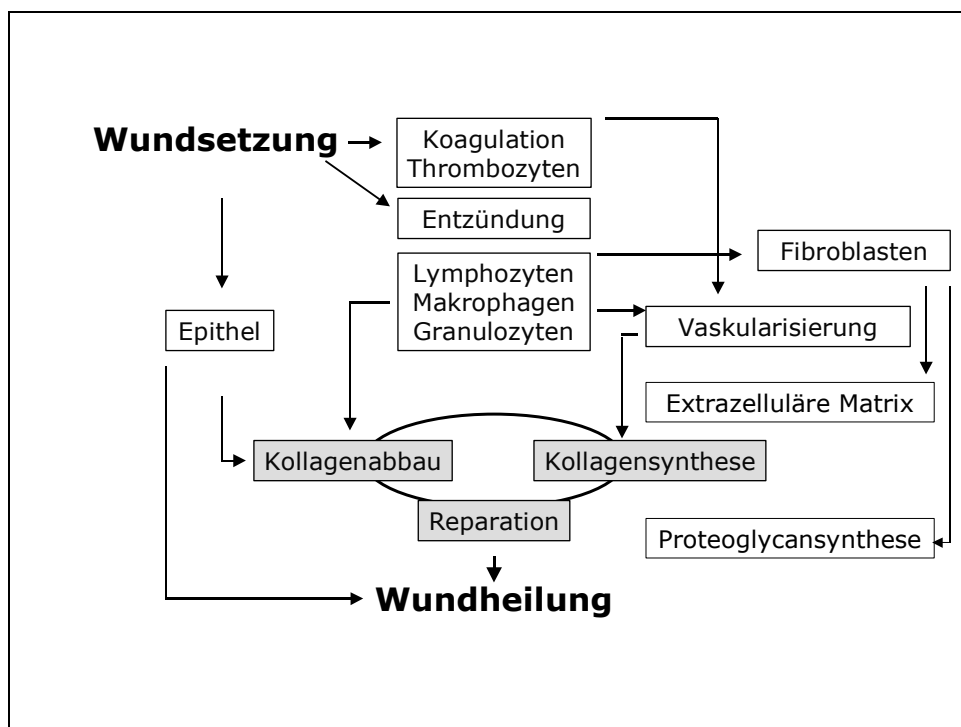


Abb. 1: Schema der physiologischen Wundheilung nach Hunt (11).

Das Hauptereignis stellt zunächst die Verletzung dar. Der darauf folgende Sauerstoffmangel bewirkt eine Anregung der Glykolyse. Gleichzeitig werden verschiedene Substanzen freigesetzt. Die Mastzellen produzieren Serotonin und

Histamin. Zusätzlich werden aus den Zellmembranen und verstoffwechselten Leukozyten Prostaglandine und Leukotriene gebildet (6;7). Es folgt darauf eine Ausschüttung von Katecholaminen, was zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität führt. Die Glykolyse und die daraus resultierende Verschiebung des pH Wertes hat eine Depolymerisierung der Glykosaminoglykane zur Folge. Dadurch wird ein Zerfall des Proteoglykankomplexes hervorgerufen und somit Kollagen freigesetzt.

Der Kollagenfreisetzung folgt die Einwanderung und Aggregation von Thrombozyten. Von den Thrombozyten wird der Plättchenfaktor III freigesetzt, der die Fibroblastenreplikation sowie die vaskulären Endothelzellen stimuliert (7). Durch aktivierte Gewebsmakrophagen werden Lymphozyten, Makrophagen und Granulozyten angeregt, welche zerstörtes Gewebe phagozytieren und zu Kollagenabbau führen.

Die proliferative Phase der Wundheilung ist gekennzeichnet durch die Neoangiogenese und die Fibroblastenproliferation. Die Fibroblasten synthetisieren Kollagen.

Makrophagen produzieren Fibroblasten-Wachstumsfaktor (fibroblast growth factor). In Kombination mit dem noch vorhandenen Kollagen entsteht so ein chemotaktischer Reiz auf Fibroblasten, die dann in das Wundgebiet einsprossen. Das Glykoprotein Fibronectin dient als Adhäsions-Ligand zwischen den Zellen, Fibrin und dem entstehenden Kollagen (6;8).

Der von den Thrombozyten stammende Wachstumsfaktor (platelet derived growth factor-PDGF) wirkt zusammen mit noch vorhandenem intaktem Kollagen als chemotaktischer Reiz auf die Fibroblasten, die als Myofibroblasten in das Wundgebiet einwandern.

Durch den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) werden Lymphokine vermehrt zur Proliferation und Proteinsynthese angeregt. Prokollagen wird produziert (9).

Im Rahmen der nachfolgenden Kollagensynthese entsteht in der proliferativen Phase zunächst Typ III Kollagen (6;8;10). Gleichzeitig wird in den Fibroblasten die Glykosaminoglykansynthese angeregt, wobei überwiegend Hyaluronsäure gebildet wird.

Im Vordergrund der reparativen Phase steht die gesteigerte Synthese der DNA und RNA von Kollagen und Glykosaminoglykanen. Normofibroblasten bilden im Verlauf

Dermatansulfat und Typ-I-Kollagen. Daraus entstehen Chondro-Protein-Komplexe. Die Kollagenfibrillen werden verfestigt.

Nach 10-14 Tagen kommt es zum Wundverschluß. Anfangs überwiegen noch Kollagen Typ III und Hyaluronsäure. Erst nach längerer Zeit werden während der Narbenbildung die embryonalen Typen durch längere und feste Fasern des Kollagen Typ I ersetzt (7).

1.3 DIE DIABETISCHE WUNDE

Chronische Wunden stellen heute eines der kostenintensivsten Probleme des Gesundheitswesens dar. In Deutschland wurden für das Jahr 1998 etwa 3,5 Millionen an Diabetes Typ II erkrankte Menschen (5 % der Bevölkerung) geschätzt.

Die medizinischen Kosten für die Behandlung pro Patient liegen bei etwa 2800 Euro pro Jahr. Die volkswirtschaftlichen Kosten belaufen sich sogar auf 4600 Euro pro Jahr. Die Gesamtausgaben der gesetzlichen Krankenversicherungen erreichen damit einen Betrag von 9,4 Milliarden Euro pro Jahr, was 7 % der jährlichen Gesamtausgaben der gesetzlichen Krankenversicherungen entspricht. An volkswirtschaftlichen Kosten errechnen sich 16 Milliarden Euro pro Jahr. Weitere wichtige Kostenträger im Zusammenhang mit Diabetes mellitus sind, neben den gesetzlichen Krankenversicherungen (59 %), die Rentenversicherungen (18 %) und die Pflegeversicherungen (14 %). Aus diesen Zahlen wird neben der klinischen Bedeutung auch die ökonomische Relevanz von Wundheilungsstörungen verdeutlicht (12).

Abbildung 2 beschreibt die Pathophysiologie der diabetischen Wunde. Der chronischen Wunde liegt eine Wundheilungsstörung zugrunde. Dazu zählt man z.B. Druckgeschwüre, diabetische Ulzera oder Ulcus cruris. Diese Wunden heilen oft bis zu einer bestimmten Phase, in welcher der Heilungsprozess zum Stillstand kommt. Welche genauen Faktoren bei der Pathophysiologie dieser Stagnation der Wundheilung eine Rolle spielen, ist bis heute noch unbekannt. Chronische Geschwüre bei Diabetes mellitus treten typischerweise in Form des diabetischen Fußes auf. Dabei können Druck und kleine Traumata als auslösende Faktoren angesehen werden. Die Hauptursache dieser Krankheit ist die diabetische Neuropathie (13). Der Verlust von Sensibilität bewirkt einen erhöhten mechanischen

Stress unter den Metatarsalköpfchen, Ferse und Kallus. Das wiederum führt zu intermittierender oder andauernder Ischämie, mit der Folge von Druckgeschwüren. Zusätzlich verhindert eine fortgeschrittene Neuropathie das rechtzeitige Erkennen von Fremdkörpern in Schuhen oder Läsionen der Füße.

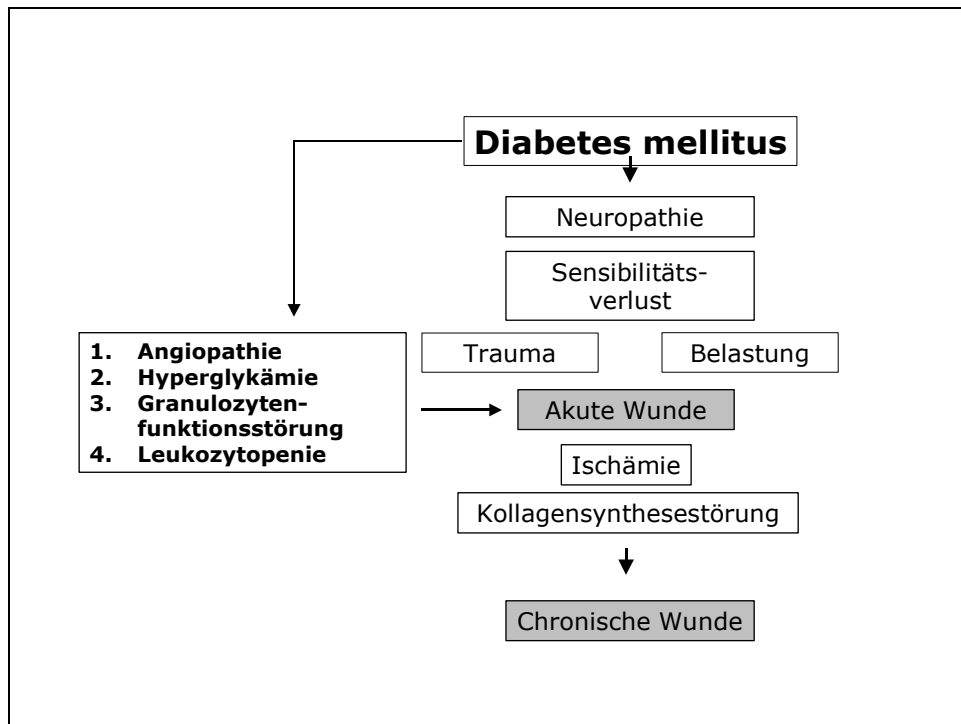


Abb.2 : Schema des Heilungsvorganges bei diabetischen Wunden

Zusätzlich zur Neuropathie, neigen Diabetiker zu einer Angiopathie. Die einzelnen Kapillaren sind dicker und permeabler bei Patienten mit Langzeitdiabetes (14). Zudem ist die Anzahl der Kapillaren vermindert. Auch die Funktion der Granulozyten in Bezug auf Chemotaxis und Phagozytose ist gestört. Typisch für die diabetische Wunde sind geringere Konzentrationen an extrazellulären Matrixkomponenten. Das Kollagen ist der nichtenzymatischen Glykosilierung unterworfen, welche die Filterfunktion der Basalmembranen verändert und somit zu vielen diabetesspezifischen Pathologien führt (13).

Bei einer diabetischen Stoffwechselleage ist die Fähigkeit der Leukozyten eingeschränkt, in das Wundgebiet zu einzuwandern (15). Darüber hinaus verhindert eine Hyperglykämie von über 250 mg/dl die Phagozytose von Bakterien. Aufgrund

des verminderten kapillären Blutflusses und des daraus folgenden Sauerstoffdefizites kommt es zu Störungen bei den Wundheilungsphasen wie zum Beispiel zu einer verminderten Kollagensynthese (4).

Neuere Ergebnisse weisen darauf hin, dass darüber hinaus funktionelle und morphologische Veränderungen in der Mikrozirkulation pathogenetisch bedeutsam sind. Die Wertigkeit der Mikroangiopathie und die Aussagekraft mikrozirkulatorischer Untersuchungsmethoden bei der Diagnosestellung und im Verlauf sind noch unklar. Bekannt ist jedoch, dass das kapillare Netzwerk bei Diabetes Typ I der Fußzehen im Vergleich zu Gesunden stark vermindert ist, unabhängig davon ob Spätkomplikationen vorhanden waren oder nicht (16-18).

1.4 C-PEPTID

Humanes Insulin wird in den β -Zellen des Pankreas gebildet als Teil eines Proinsulin-Moleküls, das aus einer A- und einer B-Kette besteht. Diese beiden Ketten sind durch ein 35-Aminosäurepolypeptid miteinander verbunden, welches in das 31-Aminosäureverknüpfungspeptid umgewandelt wird (C-Peptid). C-Peptid ist ein Spaltprodukt von Proinsulin zu Insulin (siehe Abbildung 3). Untersuchungen haben ergeben, dass C-Peptid bei der Insulinsynthese in äquimolaren Mengen zum Insulin entsteht. Man vermutete lange, dass es keinerlei biologische Bedeutung hätte und nur ein Intermediärprodukt bei der Insulinsynthese sei (20).

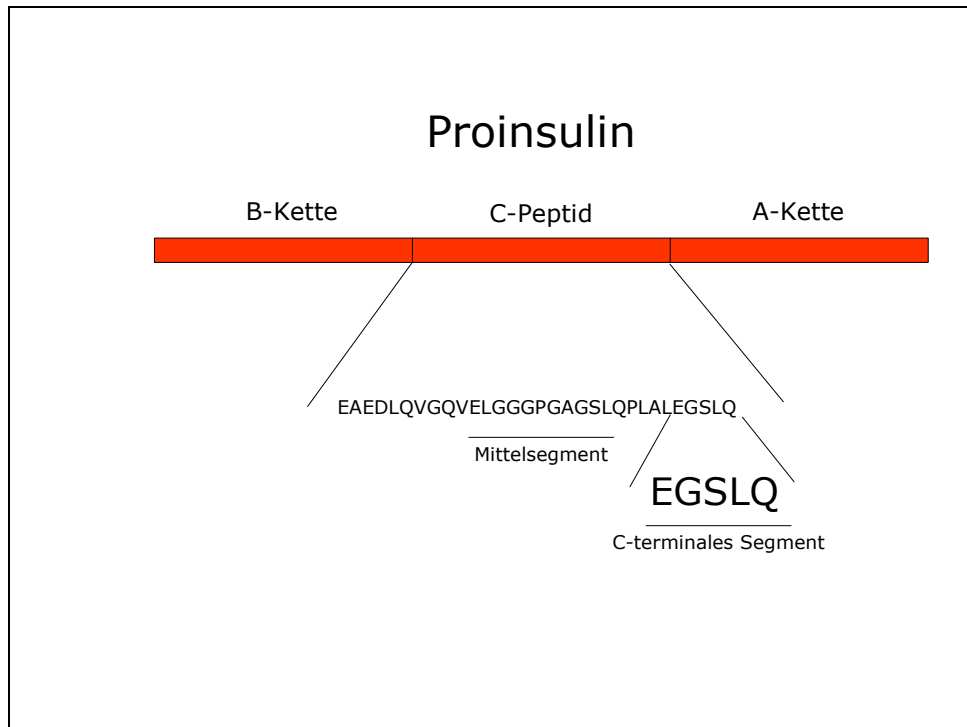


Abb. 3: Abspaltung C-Peptid von Proinsulin (20)

In neueren Studien hat man festgestellt, dass systemisch verabreichtes C-Peptid im Tiermodell zu einer Verminderung der vaskulären und neurologischen Dysfunktion führt (21). Es gibt auch Hinweise aus *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen, dass C-Peptid bei der Regulation der Insulinsynthese von Bedeutung sein könnte (22).

Der genaue Funktionsmechanismus ist noch unklar. Man geht heute von der Hypothese aus, dass C-Peptid die Natrium-Kalium-ATPase stimuliert, indem es einen G-Protein gekoppelten Rezeptor aktiviert mit einer darauffolgenden Aktivierung von Calcium-abhängigen intrazellulären Signalwegen (23). C-Peptid ist in der Lage, die autonome Nervenfunktion bei Patienten mit insulinpflichtigem Diabetes mellitus zu verbessern (24). Forst et al. untersuchten die biologische Aktivität von C-Peptid an der Hautmikrozirkulation von Patienten mit insulinpflichtigem Diabetes (25). Der Zusatz von humanem C-Peptid führte zu einer Umverteilung des mikrovaskulären Blutflusses vergleichbar dem Verteilungsmuster gesunder Probanden. Diese Beobachtungen lassen einen positiven Effekt von C-Peptid auf Störungen der Mikrozirkulation im Diabetes assoziierten Gewebe vermuten.

1.5 ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG

Um den klinischen Einsatz von C-Peptid als Therapeutikum abschätzen zu können, ist es unerlässlich, seine Effekte zunächst an einem validierten, standardisierten Tiermodell zu untersuchen. Ziel dieser Studie war es, die Auswirkungen von C-Peptid auf eine standardisierte Wunde am Ohr der haarlosen diabetischen Maus zu evaluieren.

Die Untersuchungen wurden an einer zirkulären Wunde am Ohr von diabetischen Mäusen sowie an gesunden Kontrolltieren durchgeführt.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

1. Beschleunigt die systemische Gabe von C-Peptid die Wundheilung am Ohr der diabetischen Maus?
2. Zeigt sich ein Einfluss von C-Peptid auf Gefäßdurchmesser, Erythrozytenfließgeschwindigkeit Leukozytenendothelinteraktion sowie funktionelle Kapillardichte?
3. Sind nach C-Peptid-Injektionen veränderte Konzentrationen von C-Peptid systemisch nachweisbar?

2 MATERIAL UND METHODIK

2.1 STRUKTUR UND FUNKTION VON C-PEPTID

2.1.1 Biochemischer Hintergrund

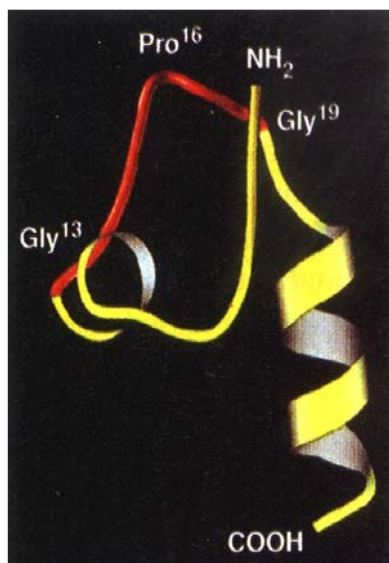


Abb. 4. Der molekulare Aufbau von C-Peptid (21)

Die Insulinbiosynthese beginnt mit Präproinsulin, welches sehr schnell zu Proinsulin umgewandelt wird. Insulin besteht aus einer A- und B-Kette. Es befindet sich bei fast allen Spezies, bis auf die Maus und einigen Fischarten, auf dem selben Genlokus auf Chromosom 11p15.5 (26).

Das humane Insulinmolekül wird von drei Exons und zwei Introns kodiert. Exon 2 kodiert das Signalpeptid, die B-Kette und Teile des C-Peptid (Connecting Peptid), Exon 3 die restlichen Teile des C-Peptids und die A-Kette (27). Wir verwendeten in unserer Untersuchung Ratten II. C-Peptid (23), welches sich von humanem C-Peptid in nur einer Aminosäuresequenz unterscheidet.

Proinsulin wird in den Langerhans Inselzellen des Pankreas im endoplasmatischen Retikulum gebildet und im Golgi Apparat gespeichert. Später wird das Proinsulin in

Sekretgranula in äquimolare Teile von Insulin und C-Peptid gespalten (28). Man konnte feststellen, dass die Sekretgranula der Betazellen nicht uniform strukturiert sind: Insulin wird in kristalliner Form im elektronendichten Kern gespeichert, während C-Peptid löslich in flüssiger Phase verbleibt (30).

Die Hauptfunktion von C-Peptid ist, während der Insulinsynthese die Faltung des Proinsulin Moleküls zu erleichtern sowie bei der Ausbildung der Disulfidbrücken zwischen den Cystin-Aminosäurenketten der A- und B-Ketten mitzuwirken. Somit leistet es einen entscheidenden Beitrag für die Formation einer geeigneten Sekundär- und Tertiärstruktur des Hormons (20). C-Peptid besteht aus 30-35 Aminosäuren (vgl. Abbildung 4). Nach der Spaltung des Proinsulins werden Insulin und C-Peptid zu gleichen Mengen in den Portalkreislauf mit kleinen Mengen von Proinsulin und Zwischenformen entlassen (28).

Die Plasmahalbwertszeit von C-Peptid beträgt ca. 30 Minuten, während Insulin nur eine Halbwertszeit von 6 Minuten aufweist. Das erklärt auch, warum man bei Messungen der C-Peptidkonzentrationen im Serum C-Peptid in höheren molaren Konzentrationen gemessen hat als von Insulin, obwohl C-Peptid und Insulin zu äquimolaren Anteilen produziert werden (30). Im Gegensatz zu Insulin, welches in der Leber abgebaut wird, findet der Abbau von C-Peptid hauptsächlich in der Niere und zum Teil auch in der Skelettmuskulatur statt (31).

2.1.2 Physiologische Bedeutung von C-Peptid

Patienten mit diabetischer Stoffwechsellage haben ein erhöhtes Risiko für mikro- und makrovaskuläre Komplikationen bezüglich der Nieren, des somatischen und autonomen Nervensystems, der Retina sowie der peripheren Arterien. Als zugrundeliegende Faktoren gelten der toxische Effekt von Hyperglykämie, die Aktivierung von Proteinkinase C und Veränderungen der zellulären Redoxpotentiale (32;33).

Spätkomplikation kommen auch bei Patienten mit sorgfältig eingestelltem Blutzucker vor. Man hat festgestellt, dass bei Diabetikern, mit einer Restfunktion in verbliebenen β -Zellen, weit weniger mikrovaskuläre Komplikationen auftraten (31;35).

Da sich der biologische Effekt von endogenem und exogenem Insulin nicht unterscheidet, liegt der Verdacht nahe, dass das Fehlen von C-Peptid bei der Pathogenese von Spätkomplikationen eine Rolle spielen könnte, zumal es bei der

endogenen Insulinsekretion anfällt (36).

Nach der Entdeckung des C-Peptids, wurden mehrere Studien veranlasst, um nach insulinähnlichen Eigenschaften zu suchen (19;31). Die Ergebnisse der Untersuchungen konnten derartige Eigenschaften nicht nachweisen. Es wurde angenommen, dass C-Peptid keine biologische Aktivität besitzt. Tierversuche zeigten, dass C-Peptid die Sekretion von Insulin und Glukagon nach Stimulierung von β -Zellen mit Glukose oder Arginin reduzieren konnte. Nachfolgende Untersuchungen am Menschen konnten diesen Effekt nicht bestätigen. (37; 38).

Experimentelle und klinische Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass die Zugabe von C-Peptid bei insulinpflichtigen Patienten mit Diabetes mellitus tatsächlich unterschiedliche positive Effekte bewirken konnte. So gab es Anzeichen dafür, dass C-Peptid den Glukosetransport stimulieren kann. Es wurden mehrere Patientenstudien durchgeführt, die eine Steigerung des Gesamtkörperglukoseverbrauches, hervorgerufen durch C-Peptid, nachweisen konnten (31;22;39). Außerdem wurde ein beträchtlich erhöhter Glukoseverbrauch bei Typ I Diabetikern verzeichnet, die verglichen mit Diabetikern, C-Peptid-Infusionen während Muskelübungen an Stelle von Kochsalzlösung erhielten. Es konnte allerdings keine Steigerung des Glukoseverbrauchs bei gesunden Kontrollpersonen durch C-Peptid nachgewiesen werden (22).

Die alleinige Insulingabe bewirkt keine Reduktion der glomerulären Hyperfiltration, die während der Frühphase des Diabetes Typ I auftritt. Fraglich war, ob C-Peptid renale Funktionen modifizieren könnte, wie z.B. die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und die Albumin-Exkretion. Untersuchungen wiesen auf einen signifikanten Abfall der GFR um 7% hin, begleitet von einem Anstieg des renalen Plasmaflusses nach einer C-Peptid Infusion bei Typ I Diabetikern mit Hyperfiltration (40).

In einem Doppeltblindversuch an Diabetes Typ I Patienten konnte gezeigt werden, dass die Mikroalbuminurie, als sensibler Marker für die diabetische Nephropathie, nach einer vierwöchigen Gabe von Insulin und C-Peptid vermindert wurde. In der Kontrollgruppe, der nur Insulin verabreicht wurde, konnte keine verminderte Mikroalbuminurie festgestellt werden (41). Eine Langzeitstudie mit C-Peptidgabe über 3 Monate bestätigte diese Ergebnisse. Auch hier wurde ein signifikante Reduktion der Albuminexkretion beobachtet (42).

Eine andere Langzeitkomplikation beim Typ I Diabetes mellitus ist die diabetische

Neuropathie. Diese Störung kann sowohl die peripheren Nerven als auch das autonome Nervensystem betreffen. Eine autonome Neuropathie wird bei ca. 40% der Patienten gefunden. Die Ätiologie der Neuropathie ist noch nicht vollständig geklärt. Neben metabolischen Effekten der Glukose sollen vor allem eine gestörte Funktion der Nervenleitbahnen eine entscheidende Rolle spielen (43;44).

Forst et al. untersuchten in einer Studie die Auswirkungen von C-Peptid auf die Nervenfunktion von Typ I Diabetikern (45). Dabei konnte ein positiver Effekt von C-Peptid auf das autonome Nervensystem festgestellt werden. Hingegen wurden die Variablen des peripheren sensorischen Systems (Vibrationsempfinden, Warm-Kaltempfinden, Hitze-Schmerz-Grenze und Nervenleitgeschwindigkeit) nicht signifikant beeinflusst. Daneben zeigte eine andere Studie eine Verbesserung der sensorischen Neuropathie mit gesteigertem Empfindungsvermögen für Temperatur (45).

Mehrere Studien wurden veröffentlicht, die sich mit den Auswirkungen von C-Peptid auf die Mikrozirkulation der Haut beschäftigen (42). Johansson et al. konnten eine Zunahme des Blutflusses, des Sauerstoffverbrauchs und der kapillaren Diffusionskapazität am trainierenden Unterarm bei Typ I Diabetikern nach intravenöser Gabe von C-Peptid beobachten (22). Bei gesunden Kontrollen hingegen wurde kein nennenswerter Einfluss des C-Peptids beobachtet. Die Infusion von C-Peptid führte zu einer Neuverteilung der Hautmikrozirkulation vergleichbar mit der von Gesunden, indem es die Blutflussgeschwindigkeit und die kapilläre Diffusionskapazität erhöhte (45).

Die Mehrheit der Studien weist auf einen positiven Effekt von C-Peptid auf renale und neuronale Funktionen bei Diabetes Typ I hin (45;21). Auch ein vermehrter Sauerstoffverbrauch, eine Verbesserung des Glukosestoffwechsels sowie eine verbesserte Mikrozirkulation der Haut und des Skelettmuskels konnten beobachtet werden (22;46).

Es gibt bereits mehrere Überlegungen bezüglich des Wirkmechanismus von C-Peptid. Während spezielle Bindungen von C-Peptid an Zellen eines Insulinoms nachgewiesen wurden (47), konnte dies für andere Zellen bzw. deren Zelloberflächenrezeptoren bislang nicht gefunden werden. Dennoch kann man aufgrund der vorhandenen Information vermuten, dass der biologische Effekt von C-Peptid an spezielle Prozesse einer transmembranösen Signaltransduktion

gebunden ist. Man hat bereits beobachtet, dass die Aktivität der Natrium-Kalium-ATPase in manchen Zelltypen unter diabetischen Konditionen vermindert war (48) (49) (50). Ohtomo et al. untersuchten unter diesem Aspekt den Einfluss von C-Peptid auf die Natrium-Kalium-ATPase in proximalen Nierentubulussegmenten. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Stimulierung des Enzyms (51). Dieser Effekt von C-Peptid konnte jeweils durch Vorbehandlung mit Pertussistoxin verhindert werden.

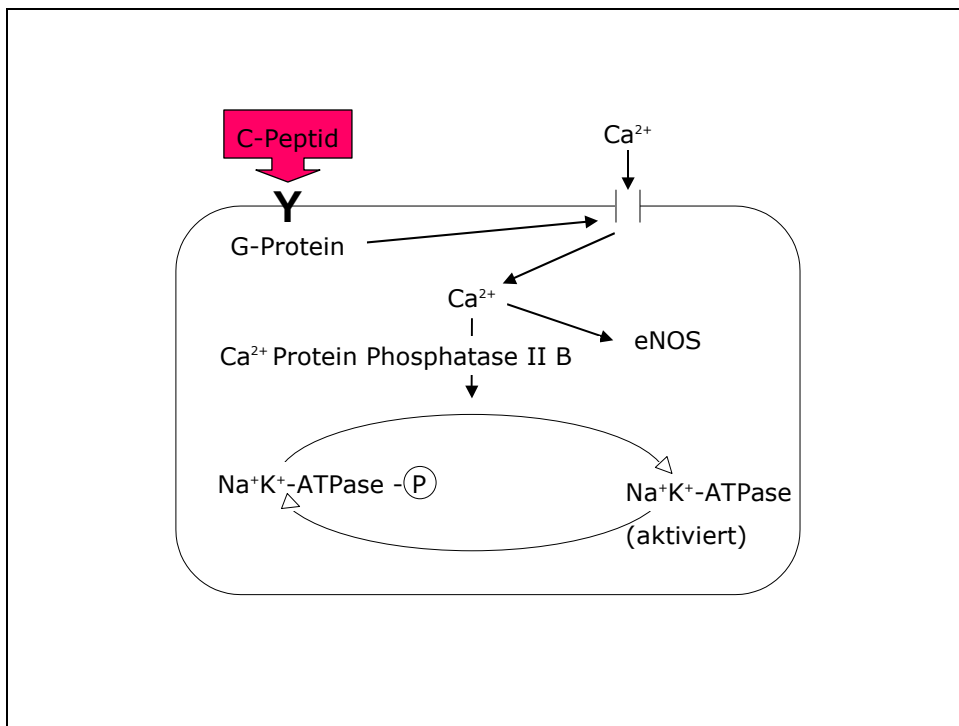


Abb. 5. G-Protein gekoppelte Signaltransduktion von C-Peptid (20).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass C-Peptid die Aktivität der Natrium-Kalium-ATPase stimuliert. Man nimmt an, dass dieser Mechanismus auf einen Pertussis-sensitiven G-Protein-gekoppelten Rezeptor zurückzuführen ist, wobei die nachfolgende Signaltransduktion wahrscheinlich Teil eines Ca^{2+} -abhängigen Second Messengers ist (vgl. Abb. 5). Einige Studien, untersuchten die Wirkung von einzelnen Fragmenten des C-Peptidmoleküls auf die Natrium-Kalium - ATPase (51). Dabei zeigten sich bei zwei verschiedenen Fragmenten stimulatorische Effekte. Ein Fragment war an der COOH-terminalen Seite des C-Peptidmoleküls, das andere im Mittelsegment lokalisiert.

Die Untersuchungen erhärten die Vermutung, dass es sich beim Wirkmechanismus

von C-Peptid um eine Rezeptor-Liganden-Interaktion handelt.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse aller Studien auf eine biologische Aktivität im Sinne von C-Peptid hin. Die Möglichkeit eines positiven Effekts von C-Peptid in der Therapie von Typ I Diabetikern erfordert eine genauere Analyse.

2.2 DIE HAARLOSE MAUS

2.2.1 Die haarlose Maus als Versuchstier

Bei den haarlosen Tieren liegt ein homozygoter Defekt auf Chromosom 14 (hr/hr) vor. Die Tiere entwickeln nach der Geburt ein regelrechtes Haarkleid. Nach dem 10. Tag kommt es jedoch zu einem irreversiblen Haarausfall (52). Sie ähneln dann den weit bekannteren Nacktmäusen (nu/nu). Im Gegensatz zu Nacktmäusen, die keine Thymusdrüse und somit keine immunkompetenten T-Zellen besitzen, handelt es sich jedoch bei haarlosen Mäusen um immunkompetente Tiere.



Abb. 6: Die haarlose (SKH-1) Maus

Die haarlose Maus als Versuchstier für *in vivo*-Studien der Hautmikrozirkulation, wurde 1980 von Elof Eriksson und Mitarbeitern erstmals eingeführt. In unserer Untersuchung wurde das von Barker und Mitarbeitern etablierte Modell der Wunde am Ohr der haarlosen (SKH-1) Maus verwendet (52). Dieses Tiermodell erlaubt chronische mikrozirkulatorische Untersuchungen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen. Die dafür notwendigen mikrochirurgischen Eingriffe sind wenig invasiv und führen daher zu keiner wesentlichen Traumatisierung des zu untersuchenden Hautareals.

Neben den intravitalmikroskopischen Untersuchungen können vom Ohrgewebe auch histologische Schnitte für immunhistochemische Untersuchungen angefertigt werden.

2.2.2 Das Ohr der haarlosen Maus

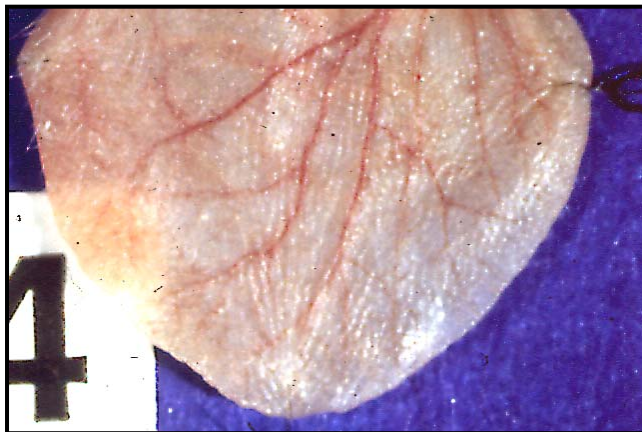


Abb. 7: Übersichtsaufnahme vom Ohr der haarlosen Maus

Das Ohr der haarlosen Maus ist im Verhältnis zum Körper der Maus sehr groß. Es misst in Länge und Breite 13 mm und hat einen Anteil an der Gesamtkörperoberfläche von etwa 6% (53). Das Ohr ist im Durchschnitt 300 µm dick und dreischichtig aufgebaut. Es besteht aus zwei Hautschichten, die in der Mitte durch eine Schicht elastischen Knorpel getrennt sind (53).

Das Epithel besteht aus 2-3 Zellschichten und ist durch ein hyperkeratotisches Stratum corneum und eine über die gesamte Oberfläche variierende Anzahl von Haarfollikeln gekennzeichnet. Das Stratum germinativum liegt der dünnen Basalmembran an, die durch den Mangel an typischen Hautpapillen einen leicht

welligen Verlauf nimmt. In der darunter liegenden Dermis finden sich alle großen Blutgefäße, Nerven und quergestreifte Muskelfasern. An die Dermis grenzt die dünne hyaline Knorpelschicht an, die eine Dicke von ungefähr 80-100µm aufweist (53). Der hyaline Knorpel reicht von der Basis durch das gesamte Ohr, wird aber zu den Rändern hin dünner (30-50µm). Der Knorpel besteht aus Lipochondrozyten, die durch einen großen Lipidtropfen gekennzeichnet sind, der nur von einem dünnen Plasmasaum umgeben ist (54).

2.2.2.1 Die Gefäßarchitektur

Das Ohr wird von drei großen an der Basis entspringenden Gefäßnervenbündeln versorgt. Diese bestehen jeweils aus einer Arteriole, einer Venole und einem begleitenden Nerven (53). Die Arteriolen verzweigen sich Y-förmig und teilen sich von Gefäßen erster Ordnung bis zu Gefäßen vierter Ordnung auf (54). In der Peripherie des Ohres stehen die Gefäße bogenförmig miteinander in Verbindung. Die Durchmesser der Venolen liegen zwischen ca. 20 µm (postkapilläre Venolen) und ca. 130 µm (Venolen an der Ohrbasis). Die Durchmesser der Arteriolen betragen 50-60µm bei Gefäßen erster Ordnung und ca. 10-15 µm bei Gefäßen vierter Ordnung, den präkapillären Arteriolen. Letztere gehen in die 4-8 µm breiten Kapillaren über, die ein weitmaschiges dreidimensionales Netzwerk in der Dermis bilden und die leeren Haarfollikel schleifenförmig umlaufen. Neben diesem, besonders in der Peripherie sehr ausgeprägten Kapillarmuster, finden sich im Bereich der Ohrbasis in geringer Zahl auch Skelettmuskelkapillaren mit einem charakteristischen parallelen Verlauf (54).

2.3 VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

2.3.1 Haltung der Tiere

Alle Versuche wurden an 8 bis 12 Wochen alten haarlosen Mäusen mit einem Körpergewicht von 20 bis 25 g durchgeführt (Charles River, Sulzfeld).

Die Tiere wurden bei einem 12-stündigen Tag- und Nachtrhythmus in Einzelkäfigen mit Standardfutter (18000 IE/kg Vit A, 1280 IE/kg Vit. D3, 120 mg/kg Vit. E; Sniff, Spezialdiäten, Soest) und Wasser *ad libitum* gehalten. Die Raumtemperatur im Tierstall betrug konstant 24 °C, die Luftfeuchtigkeit 50 %.

2.3.2 Induktion einer diabetischen Stoffwechsellage

Eine dreimalige Injektion von 60 mg Streptozotocin (N-Methylnitrosocarbamyl-D-Glukosamin, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) pro kg Körpergewicht in eine Schwanzvene, jeden zweiten Tag, induziert durch eine irreversible Zerstörung der β -Zellen des Pankreas eine diabetische Stoffwechsellage (55-57). Diese Injektion wird unter einer Narkose mit Isofluran vorgenommen. Am ersten Tag des Versuchsprotokolls wird der Maus über die Schwanzvene ein Tropfen Blut entnommen und der Blutzucker bestimmt. Ein Wert über 3 mg/ml Blutzucker ist Einschlusskriterium für den Versuch (58).

Die Methode des streptozotocininduzierten Diabetes ist ein bekanntes und akzeptiertes Model und wurde schon für vorangegangene Studien eingesetzt (59;60).

2.3.3 Darstellung des Ohres

Für die Injektionen, die mikrochirurgischen Präparationen sowie die intravitalmikroskopischen Aufnahmen, wurden die Tiere unter Isofluran-Narkose auf einer Plexiglasbühne gelagert. Die 24 x 14 x 0,5 cm große Plattform besaß eine verschiebbliche dem Viertel eines Kreises entsprechende Plexiglasröhre mit zwei Feststellschrauben, in der die Tiere auf dem Bauch liegend immobilisiert wurden. In der Mitte der Plattform war ein Objektträgerglas eingelassen, über welches das Ohr zur makroskopischen und mikroskopischen Beobachtung sowie zur Durchführung

kleiner Eingriffe flach ausgestreckt wurde. Dies wurde durch 6-0 Seidenfäden (Ethicon) ermöglicht, die durch drei permanente am Ohrrand angebrachte Halteschleifen (9-0 Prolene, Ethicon) hindurchgezogen und mit Klebeband fixiert wurden.

2.3.4 Injektionen

2.3.4.1 Injektion zur Erzielung einer diabetischen Stoffwechsellage

Alle Injektionen wurden mit einer dünnen Injektionsnadel (Sterican 27 G; Braun AG, Melsungen) und einer Mikroliterspritze unter einem Operationsmikroskop (M650 Wild Heerbrugg, Schweiz) durchgeführt.

Zur Erzielung des Diabetes wurden 60 mg Streptozotozin (STZ) pro kg Körpergewicht in eine Schwanzvene unter Isoflurannarkose injiziert. Teilweise wurde ein Stauschlauch eingesetzt.

2.3.4.2 Injektion des Fluoreszenzmarkers

Vor jeder intravitalmikroskopischen Aufnahme wurden 0,2 ml 2 %igen Fluoresceinisocyanatdextrans (FITC- Dextran) mit einem Molekulargewicht von 150 000 (Sigma Chemicals Co., St.Louis, MO, USA) als Fluoreszenzfarbstoff in die Schwanzvene injiziert.

Zur Anfärbung der Leukozyten wurde Rhodamin 6 G (Sigma, Chemicals Co., St. Louis, MO, USA) als Bolus von 0,15 mg/kg 10 Minuten vor den Messungen injiziert.

2.3.4.3 Subkutane Injektion von C-Peptid und PBS

Vor der Applikation wurde eine C-Peptid-Lösung hergestellt. Dafür wurde das reine C-Peptid (Schwarz Pharma AG) in PBS (phosphate buffered saline) gelöst (8 g NaCl, 0,2 g KH_2PO_4 , 1,35 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pro Liter; pH: 7,0-7,3; Osmolalität 270-310; mit/ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) um eine Konzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ zu erhalten. Diese Lösung wurde in sterile einzelne Mikroliterspritzen aufgezogen und portionsweise bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren und bei Bedarf dann auf $24\text{ }^\circ\text{C}$ aufgewärmt.

Es wurde ein Volumen, abhängig vom Gewicht des Tieres, von 50-100 μl injiziert. Die genaue Dosis betrug 36 nmol Ratten-C-Peptid/kg Körpergewicht (108,75 $\mu\text{g/kg}$

Körpergewicht). Diese Menge wurde 2 x täglich (8:00 Uhr/ 20:00 Uhr) mit einer Nadel (Sterican 27 G, Braun AG, Melsungen) subkutan injiziert, nachdem das betreffende Areal mit einem Desinfektionsspray (Kodan Tinktur forte, Schülke & Mayr, Norderstedt) desinfiziert worden war.

Der Kontrollgruppe wurde unter gleichen Bedingungen die entsprechende Menge PBS injiziert.

2.3.5 Chirurgische Eingriffe

2.3.5.1 Wundsetzung

Abbildung 9. zeigt die Wunde in 40-facher Vergrößerung und Abbildung 10 im histologischen Schnittbild in 50-facher Vergrößerung. Die Wundsetzung erfolgte nach dem etablierten Modell von Bondar und Mitarbeitern (3). Dazu wurde das Versuchstier auf der Plexiglasbühne platziert. Das zu untersuchende Ohr wurde vorsichtig mit der ventralen Seite nach unten gerichtet, möglichst flach zur Plexiglasplatte ausgezogen und entsprechend mit Halteschlaufen und Haltefäden fixiert (61;62).

Unter dem Operationsmikroskop (Wild, Heerbrug, Schweiz) wurde nun eine 5 mm² große Wunde mit Hilfe einer mikrochirurgischen Schere (Aesculap, Tuttlingen), in die obere Hautschicht präpariert, nachdem dieses Areal vorher mit einem Stempel (Durchmesser 2,5 mm) markiert worden war. Die Tiefe der Präparation beträgt ca. 120 µm und reicht bis auf den subkutan gelegenen hyalinen Knorpel (vgl Abb. 9).

Nach Beendigung der intravitalmikroskopischen Messungen, wurde die Wunde mit einer, der Wundform und Größe angepassten, selbstklebenden Operationsfolie (Opraflex, Lohmann GmbH, Neuwied) abgedeckt, wodurch das Risiko von mechanischen Verletzungen gering gehalten werden konnte.

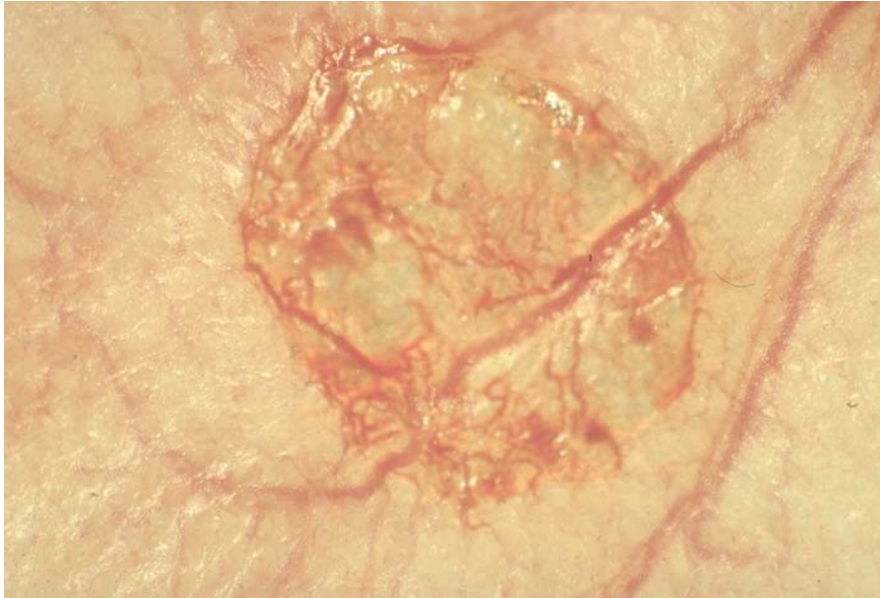


Abb. 9: Makroskopische Ansicht der Wunde am Tag der Präparation (Vergrößerung 40-fach)

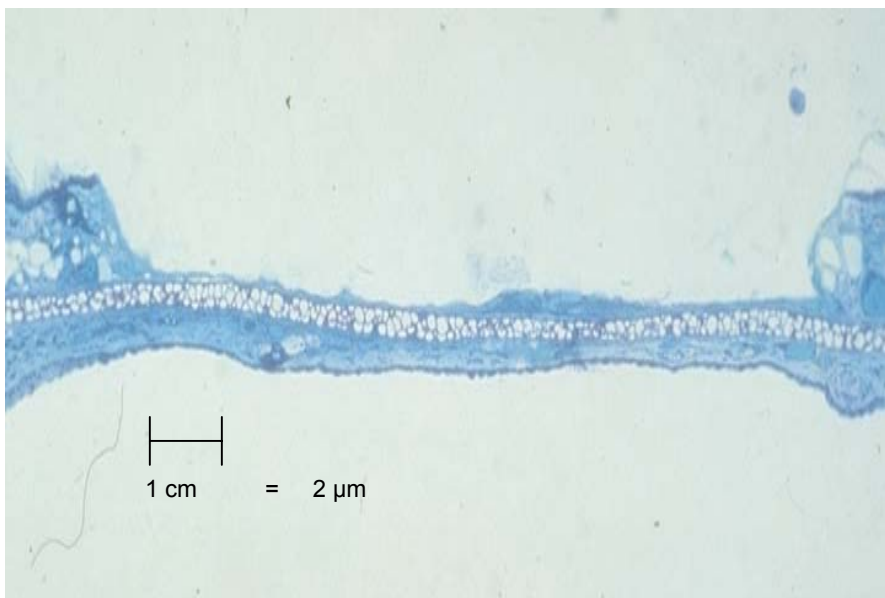


Abb. 10: Histologischer Schnitt der Wunde. Man erkennt deutlich den dreischichtigen Aufbau des Ohres, mit einer oberen Hautschicht, die hier im Bereich der Wunde bis auf den Knorpel entfernt ist. Die mittlere Schicht stellt den hyalinen Knorpel dar mit der darunterliegenden unteren Hautschicht. Maßstab 1:50 (von Priv. Doz. Dr. Uhl zur Verfügung gestellt)

2.3.5.2 Narkose

Für alle invasiven Eingriffe, eingeschlossen die intravenösen Injektionen, verwendeten wir eine Inhalationsnarkose mit Isofluran-N₂O (FiO₂ 0.35, 0.015 L/L Isoflurane, Forene, Abbott GmbH, Wiesbaden) . Diese wurde der Maus über eine spezielle Gesichtsmaske der Maus zugeführt. Die Maske wurde mit Klebeband am Plexiglasrestrainer befestigt.

2.4 BILDAUFNAHME UND VERARBEITUNG

2.4.1 Die Intravitalmikroskopie

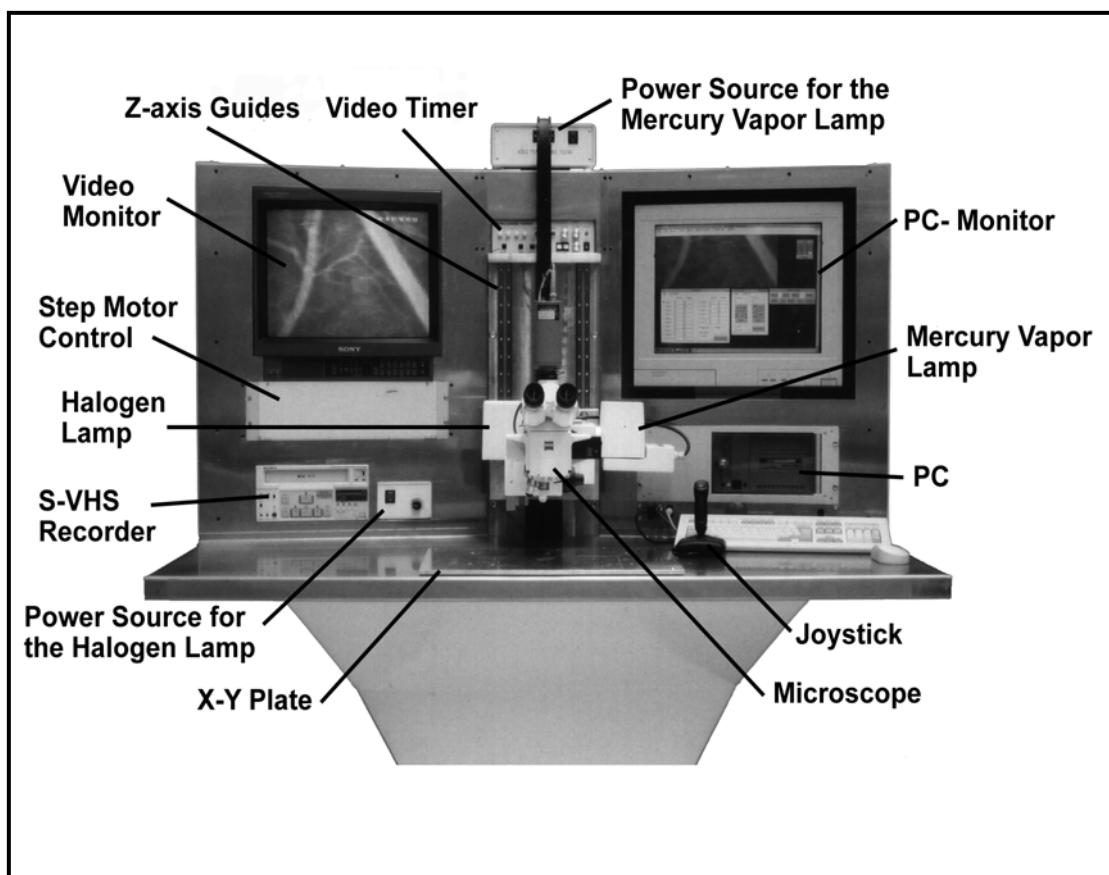


Abb. 11: Aufbau des Intravitalmikroskops (nach Harris et al. 1997)

Nachdem das zu untersuchende Ohr der Maus mit Hilfe der permanenten Halteschlaufen ausgelagert worden war, wurde das Tier auf die computergesteuerte

Bühne des Intravitalmikroskops (IVM) auf dem Bauch liegend gelagert. Unter der Bühne befand sich eine Heizplatte, welche die Körpertemperatur der Maus konstant auf 37 °C hielt.

Der intravitalmikroskopische Arbeitsplatz war mit einem in x- und y-Richtung beweglichen Mikroskoptisch ausgestattet, der mit Hilfe eines computergesteuerten Schrittmotors das wiederholte exakte Wiederauffinden identischer Gefäßsegmente auch zu späteren Beobachtungszeitpunkten ermöglichte.

Die Beurteilung der Mikrozirkulation erfolgte mittels Durchlicht oder Auflicht. Es wurden Salzwasserimmersionsobjektive (Zeiss Axiotech, Zeiss, Oberkochen) mit einer 2,5-fachen und 20-fachen Vergrößerung verwendet, die zu einer Totalvergrößerung von 57-fach/ bzw. 533-fach führten. Zur Kontrastverstärkung während der Mikroskopie (Mikrogefäße vs. extrazelluläres Gewebe) wurde vor jeder Untersuchung 0,1 ml 2%iges an hochmolekulares Dextran (MW 150000) gebundenes Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) in eine Schwanzvene injiziert.

2.4.2 Fluoreszeinisothiozyanat-Dextran und Rhodamin 6 G als Fluoreszenzmarker

Wird Fluoreszeinisothiozyanat-Dextran (FITC-Dextran) mit einem Licht bestrahlt, das eine Wellenlänge unter 500 nm hat (Exzitationsmaximum 490 nm), emittiert es ein gelblich-weißes Licht mit einer mittleren Wellenlänge von 525 nm. Dadurch erscheinen die von Plasma perfundierten Gefäße hell auf dunklem Untergrund. Zur Herstellung einer 2 %igen Lösung wurden 20 mg der in Pulverform vorliegenden Substanz (Sigma Chemical, Deisenhofen) in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Anschließend wurden 0,1 ml der 2 %igen Lösung im Bolus in eine Schwanzvene injiziert.

Durch die intravenöse Injektion von 0,15 mg/kg Rhodamin 6 G (Sigma, St. Louis, USA) können zusätzlich die Leukozyten *in vivo* angefärbt werden (64). Die Fluoreszenzmarker wurden als Kombinationsbolus mit einer einzigen Spritze (Injektionskanüle Größe 20 Sterican, Braun Melsungen, Melsungen) in die Schwanzvene injiziert. Um eine Kontrasterhöhung für Fluorescein- Isocyanat Dextran (MW 150.000) zu erreichen, war an das Mikroskop ein Fluoreszenz-Auflichtilluminator (PLOEMOPAK 2, Fa. Leitz GmbH, Wetzlar) mit einem I_{2/3}-Blau (Exzitation 450-490 nm / Emission größer 515 nm) und einem N₂-Grün-Filterblock

(Exzitation 530-560 nm / Emission größer 580 nm) adaptiert, der das von einer 75 W Xenon-Hochdrucklampe (XBO 75 W/2 OFR, Osram, FRG; Lichtgehäuse 100 Z, Leitz GmbH, Wetzlar) emittierte Licht mit einer Wellenlänge zwischen 450 nm und 490 nm auf das Objekt strahlte. Im emittierten Licht wurden Wellenlängen unter 510 nm durch einen Kurzpassfilter eliminiert, so dass es nicht zur Überlagerung zwischen anregenden und emittierten Strahlen kam. Rhodamin weist im Vergleich mit FITC-Dextran ein unterschiedliches Emissionsspektrum auf. Für Rhodamin verwendeten wir daher einen N₂-Grünfilterblock.

Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder werden mit einer hochauflösenden Videokamera registriert und zur späteren Auswertung mit einem Videorecorder (26990, Piper, Schwerte) auf einem Super VHS Videoband (Sony, Köln, Germany) aufgezeichnet.

2.4.3 Das Auswertungssystem

Die Aufzeichnung der Bilder auf Videoband ermöglichte eine Auswertung der Experimente zu einem späteren Zeitpunkt. So konnten die quantitative Analyse von segmentalen Gefäßdurchmessern, segmentalen Erythrozytenflußgeschwindigkeiten, funktioneller Kapillardichte, Leukozyten-Endothel-Interaktion sowie Extravasation von FITC-Dextran als Hinweis auf erhöhte Gefäßpermeabilität zu jedem beliebigen Zeitpunkt erfolgen. Auf diese Weise konnten der Beobachtungszeitraum und die Lichtexposition so klein wie möglich gehalten werden.

Zur Messung der mikrozirkulatorischen Parameter wurden pro Tier vier sog. *sites of interest* definiert, die insgesamt 10 Venolen, 6 Arteriolen und 5 Kapillarfelder enthalten.

Die Leukozyten-Endothel-Interaktionen wurden *off-line* über Fenster-zu-Fenster Beobachtungen analysiert. Die anderen Parameter wurden mittels Cap ImageTM, einem speziellem Computerprogramm (Dr. Zeintl, Heidelberg, Germany) ausgewertet (64).

2.4.4 Messung der mikrozirkulatorischen Parameter

Zu Beginn der Untersuchungen wurde das Ohr unter Vermeidung von Mikrotraumata möglichst flach auf dem Objektträger ausgespannt. Zum Erreichen einer besseren

Adhäsion mit dem Objektträger, wurde zuvor unter die auf dem Objektträger liegende Ohrfläche mit einer Mikroliterspritze ein Tropfen Kochsalzlösung gegeben.

Am ersten Meßtag, dem Tag der Wundsetzung, wurde zunächst das gewünschte Wundareal mit einem Stempel (Durchmesser 2,5 mm) blauer Tinte markiert. Anschließend wurde der grobe Gefäßverlauf des Ohres aus makroskopischer Sicht von Hand auf Papier aufgezeichnet. Dann wurde die Maus auf dem Plexiglasrestrainer positioniert. Die Maus wurde anschließend mit der Plattform auf den Kreutztisch gelegt und das Salzwasserimmersionsmikroskop vorsichtig in einen auf der dorsalen Seite des Ohres aufgetragenen Tropfen Kochsalzlösung eingetaucht.

In der Nähe des vorgesehenen Wundareals wurde eine charakteristische Gefäßaufzweigung aufgesucht, die als Quellpunkt festgelegt wurde und somit den Ausgangspunkt für jede weitere Messung auf der Oberfläche darstellte. Auf der Abbildung 12 sind in 46-facher Vergrößerung diese Gefäßaufzweigungen zu erkennen. Dazu wurde auch dieses Areal exakt nachgezeichnet, um so ein Wiedererkennen an jedem nachfolgenden Meßtag zu ermöglichen. Der Quellpunkt wurde mit jeder Messung durch manuelle Einstellung des Mikroskopiertisches und Vergleichen der Zeichnung wieder aufgefunden.

Danach wurde unter dem Operationsmikroskop die Wunde präpariert. Es wurden mit Hilfe des computergesteuerten Kreutztisches vier Fenster (*sites of interest*) in der Nähe des Wundareals festgelegt. Jedes der Areale sollte mehrere Venolen und Arteriolen und ein gutes Kapillarnetz enthalten. Die Größe des jeweiligen Areals betrug 0,44 x 0,31 mm. An den enthaltenen Gefäßen erfolgten die Messungen der Gefäßdurchmesser sowie der Erythrozytenflußgeschwindigkeit und die Messung der funktionellen Kapillardichte. Die Aufnahmezeit für jedes Beobachtungsfeld betrug 20 Sekunden.

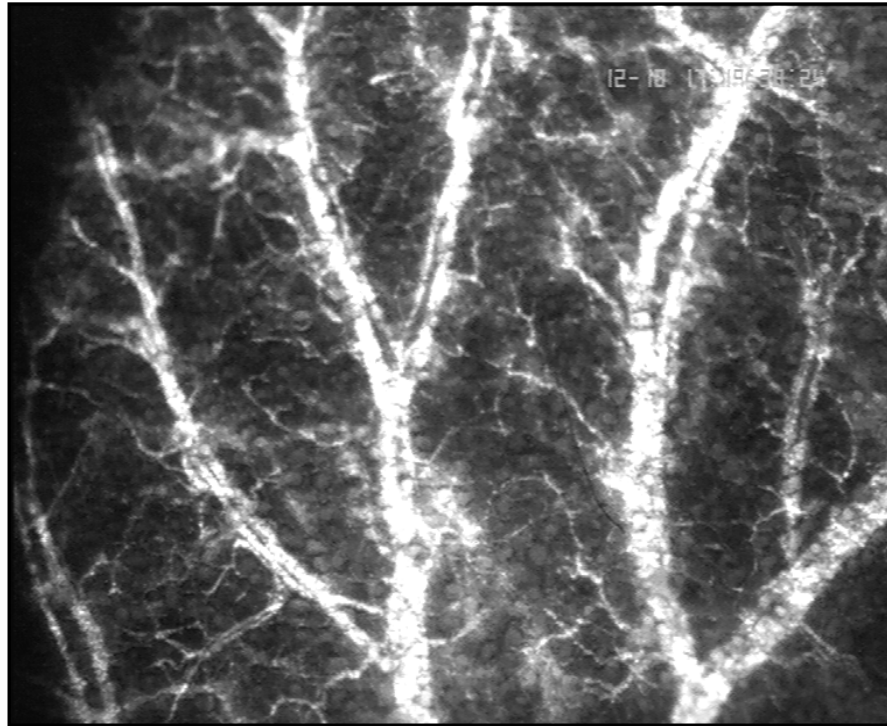


Abb. 12: Übersichtsaufnahme mittels Fluoreszenzmikroskopie.
An der Basis des Ohres am unteren Bildrand sind die
y-förmigen Aufgabelungen der Gefäße zu erkennen
(46fache Vergrößerung)

2.4.5 Funktionelle Gefäßdichte

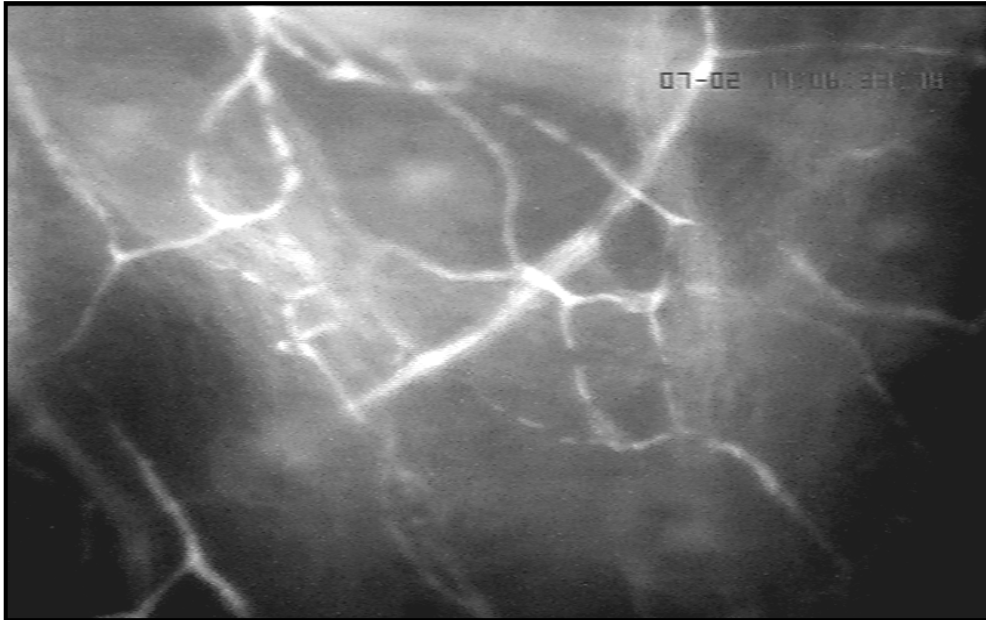


Abb. 13: Perfundierte Kapillarschlingen nach intravenöser Injektion von FITC- Dextran (Vergrößerung x 533)

Die funktionelle Kapillardichte (FKD) wird definiert als Länge der mit Erythrozyten perfundierten Kapillaren pro Beobachtungsareal. Dieser Parameter wurde als Index zur Beurteilung der Gewebepерfusion eingesetzt (65). Zur Messung der funktionellen Gefäßdichte wird das Kapillarfeld jeweils 20 Sekunden lang auf Videoband aufgezeichnet. Da die Gefäße am Ohr ein dreidimensionales Netzwerk bilden, wurden zur Erfassung aller Gefäße die verschiedenen Ebenen der Oberhaut durch langsames Auf- und Abbewegen des Objektivs durchfokussiert.

Zur Auswertung durch das Cap ImageTM-Computerprogramm (66) wurden alle mit Erythrozyten perfundierten Gefäße digital nachgezeichnet, wobei die direkt gezeichneten Linien am Monitor sichtbar wurden. Die Länge der nachgezeichneten Linien wurde dann vom Bildverarbeitungssystem durch Aufsummieren der Teilstrecken zwischen zwei benachbarten Bildpunkten berechnet, und die Gefäßdichte abhängig von der Vergrößerung als Länge der Gefäße pro Bildfläche ($\text{cm} \times \text{cm}^{-2}$) vom Computer in cm^{-1} angegeben (67).

2.4.6 Gefäßdurchmesser

Die Gefäßdurchmesser wurden ebenso mit dem Cap Image™-System ausgemessen. Hierzu wurden die Analogbilder der zu messenden Gefäße vom Videoband digital auf den mit dem Bildschirm verbundenen Farbmonitor kopiert. Nach Einstellen des Standbildes wurden die Ränder des zu messenden Gefäßes (vgl. Abb. 13) auf dem Bildschirm markiert, wobei die beiden Meßpunkte direkt auf dem Farbmonitor sichtbar wurden. Der Abstand zwischen diesen beiden Punkten wurde vom Computer entsprechend der vorgegebenen Vergrößerung in μm berechnet.



Abb. 13: Ansicht einer Arteriole (rechts) sowie einer Venole (links) nach Injektion des Fluoreszeinmarkers FITC-Dextran

(Vergrößerung x 533)

2.4.7 Erythrozytenflußgeschwindigkeit

Die Erythrozytenflußgeschwindigkeit in Arteriolen und Venolen wurde *off-line* mittels des Cap Image™ Computerprogramms ausgewertet. Das Prinzip beruht auf der Line-Shift-Methode (68). Dabei wird mit der Maus eine Linie im Verlauf des zu messenden Gefäßes entlang der Flussrichtung gezogen. Danach können Bildsequenzen mit einer Dauer bis zu einer Minute ausgewertet werden. Während

der Messung werden für jedes Halbbild die Grauwertdaten entlang der Messlinie gelesen und in einen Bildspeicher als vertikale Linien nebeneinander geschrieben. Nach Ablauf der Messsequenz wird der Bildspeicher mit den aneinandergereihten Messlinien angezeigt. Wenn sich z.B. während der Messsequenz eine helle Plasmalücke entlang der Messlinie fortbewegt, wird die Fortbewegung im Diagramm der nebeneinander gezeichneten Grauwertlinien als helle, schräg verlaufende Linie sichtbar, da die helle Plasmalücke auf der Messlinie von Halbbild zu Halbbild je nach Flussrichtung jeweils etwas nach unten bzw. nach oben wandert (Line-Shift-Diagramm). Durch Anklicken dieser schrägen Linien im Line-Shift-Diagramm wird automatisch deren Steigung ermittelt und daraus die Geschwindigkeit berechnet. Man kann auch mehrere Linien nachzeichnen und somit im Durchlauf an mehreren Stellen gleichzeitig die Geschwindigkeit messen.

2.4.8 Messung der Wundfläche

Die Messung der Wundfläche wurde unter dem Intravitalmikroskop im Durchlicht vorgenommen. Bei 57-facher Vergrößerung wurden die Wundränder direkt auf dem Bildschirm exakt nachgezeichnet. Die Wundfläche erstreckte sich über ein ganzes Mikroskopierfeld. Die Fläche innerhalb der nachgezeichneten Linie wurde mittels digitaler Planimetrie, integriert in das computergestützte Analysesystem Cap Image™, bestimmt und in mm² angegeben (66;67)

2.4.9 Messung der Endothelzellinteraktionen der Leukozyten

Abhängig von ihrer Endothelinteraktion wurden die Leukozyten in rollende und adhärente Leukozyten unterteilt (69;70) Rollende Leukozyten interagieren kontinuierlich mit dem vaskulären Endothel und bewegen sich langsamer als der Hauptblutstrom im Venolensegment. Die Frequenz der rollenden Leukozyten ist definiert als die Zahl der in einem 100 µm langen Gefäßsegment innerhalb von 20 Sekunden vorbeierollenden Zellen.

Im Gegensatz dazu wurden nur diejenigen Zellen als adhärente Leukozyten definiert, die über den Zeitraum von mindestens 20 Sekunden an einer Stelle verblieben.

2.4.10 Messung der Extravasation

Ein Beispiel einer Extravasation des Plasmamarkers zeigt Abbildung 14. Die Messung der Extravasation des Plasmamarkers FITC-Dextran dient zur Beurteilung der Endothelintegrität (71). Die Extravasation wird beurteilt, indem die Fluoreszenzintensität innerhalb des Gefäßes mit der Fluoreszenzintensität außerhalb des Gefäßes in Relation gesetzt wird.

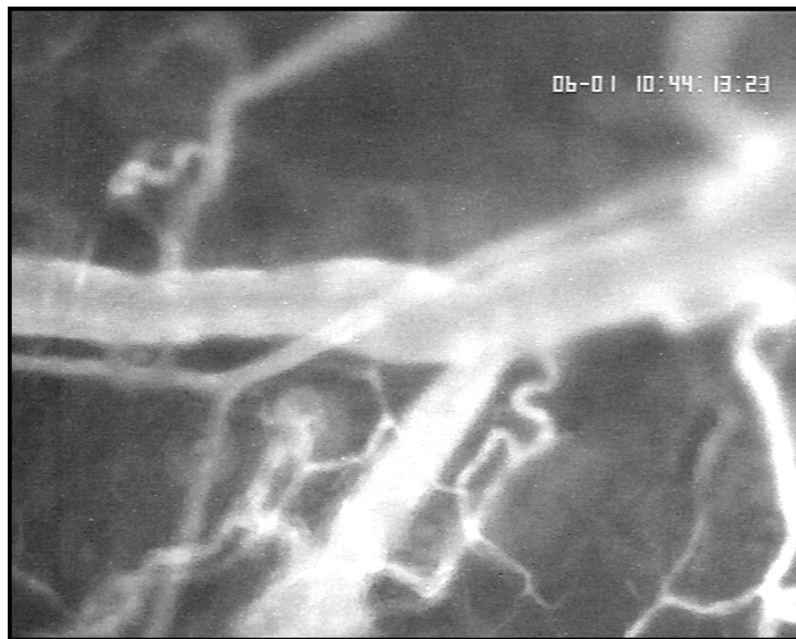


Abb. 14: Extravasation des Plasmamarkers FITC-Dextran erkennbar als perivaskuläre Gewebeaufhellung

2.4.11 Messung der C-Peptid Konzentration im Plasma

Für die Bestimmung der Konzentration von C-Peptid im Plasma wurde separaten Tieren jeweils 1 ml Vollblut pro Maus (diabetische Tiere und Kontrolltiere) an den Tagen 1, 7 und 15 durch Herzpunktion entnommen, um mindestens 0,5 ml EDTA-Plasma pro Probe zu erhalten. Die Blutentnahme erfolgte jeweils 30 Minuten nach der Applikation von C-Peptid. Die Proben wurden bis zur Zentrifugation (max. 30 Minuten) auf Eis gelegt. Das Plasma wurde unmittelbar im Anschluss gewonnen und in geschlossenen Polypropylen-Mikrogefäßen bei -80 °C eingefroren bis die C-Peptid Analyse mit einem kommerziell erhältlichen Ratten C-Peptid Radio-Immunoassay Kit (RCP-21K, Linco Research, Missouri, USA) durchgeführt wurde.

2.5 VERSUCHSDESIGN

2.5.1 Versuchsgruppen

Die Untersuchung umfasste sowohl die Messung der C-Peptidkonzentrationen im Plasma als auch die Evaluierung der Auswirkungen von C-Peptid auf die Wundheilung und die mikrozirkulatorischen Parameter.

Die Messung der C-Peptidkonzentrationen wurde im Plasma von gesunden Kontrolltieren (n=3 jeweils für die Tage 1, 7 und 15), diabetischen Tieren der PBS-Gruppe (n=3 jeweils für die Tage 1, 7 und 15) und diabetischen Tieren der C-Peptid-Gruppe (n=3 jeweils für die Tage 1, 7 und 15) vorgenommen.

Die Auswirkungen von C-Peptid auf die Wundheilung und die mikrozirkulatorischen Parameter wurden zum einen intravitalmikroskopisch, zum anderen histologisch untersucht.

Die intravitalmikroskopische Evaluierung umfasste gesunde Kontrolltiere (n=10), diabetische Tiere der PBS-Gruppe (n=10) und diabetische Tiere der C-Peptid-Gruppe (n=10).

Für die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurde die Hautwunde exzidiert.

Gewebeproben von gesunden Kontrolltieren (n=3 an den Tagen 1, 7 und 15), diabetischen Tieren der PBS-Gruppe (n=3 an den Tagen 1, 7 und 15) und diabetischen Tieren der C-Peptid-Gruppe (n=3 an den Tagen 1, 7 und 15) wurden histologisch untersucht.

2.5.2 Versuchsprotokoll

Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 15 Tagen im Rahmen der Wundheilung untersucht. Nachdem die Tiere einen manifesten Diabetes entwickelt hatten, begannen die Messungen am Tag der Wundsetzung. Etwa 30 Minuten zuvor wurde C-Peptid appliziert. Nach Wundsetzung wurde dann die Wundgröße bestimmt.

Entsprechend wurde 30 Minuten vor den intravitalmikroskopischen Aufnahmen an den Tagen 7, 10 und 15 C-Peptid subkutan injiziert. 12 Stunden später wurde nochmals C-Peptid verabreicht.

Für die Bestimmung der C-Peptid Konzentration im Plasma waren zusätzliche Gruppen (n= 3) eingeschlossen. An den Tagen 1, 7, 15 wurde den Tieren über eine linksventrikuläre kardiale Punktion 1 ml Vollblut mittels einer heparinisierten Kanüle (Sterican, G20, Braun AG, Melsungen) unter Inhalationsnarkose entnommen. Die Proben wurden sofort nach Entnahme bei 4 °C gekühlt. Anschließend wurden die Tiere mit einer Überdosis Pentobarbital getötet.

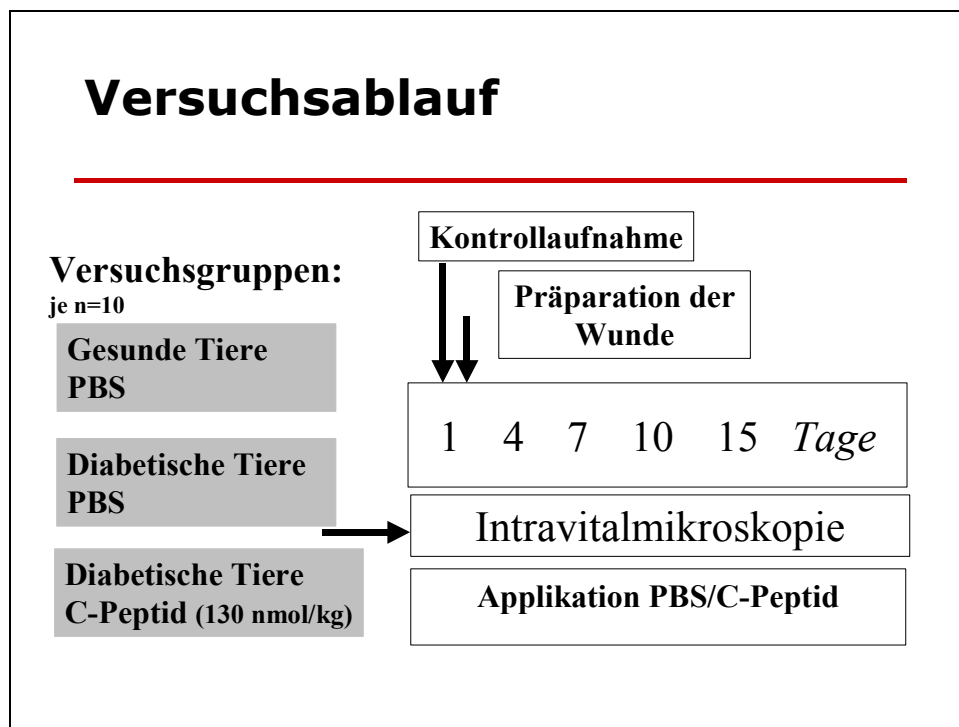


Abb. 15: Übersicht des Versuchsprotokolls

2.6 STATISTIK

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Statistikprogramms (Sigma Stat™, Jandel Scientific, Jandel Corp., USA). Es wurde ein Gruppenvergleich nach Kruskal Wallis durchgeführt gefolgt vom Dunn-Test.

Unterschiede wurden als signifikant festgelegt, wenn die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % ($p \leq 0.05$) verworfen werden konnte.

3 ERGEBNISSE

3.1 DIE INDUKTION DES DIABETES MELLITUS

Alle Tiere entwickelten nach der intravenösen Streptozotocin Behandlung einen signifikant erhöhten Blutglukosespiegel (über 300 mg/100 ml).

Somit wiesen die diabetischen Tiere schon zu Anfang des Versuchs einen wesentlich höheren Blutglukosespiegel auf (407 ± 2 mg / 100 ml bei den C-Peptid behandelten Tieren, $436 \pm 31,2$ mg / 100 ml PBS) im Vergleich zu den gesunden Tieren ($115 \pm 10,9$ mg/ 100 ml). Dieser signifikante Unterschied blieb im Verlauf des Versuchs erhalten und stieg bei den beiden diabetischen Gruppen sogar noch etwas an auf Werte zwischen 500 und 600 mg/100 ml.

C-Peptid hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Blutzuckerwert.

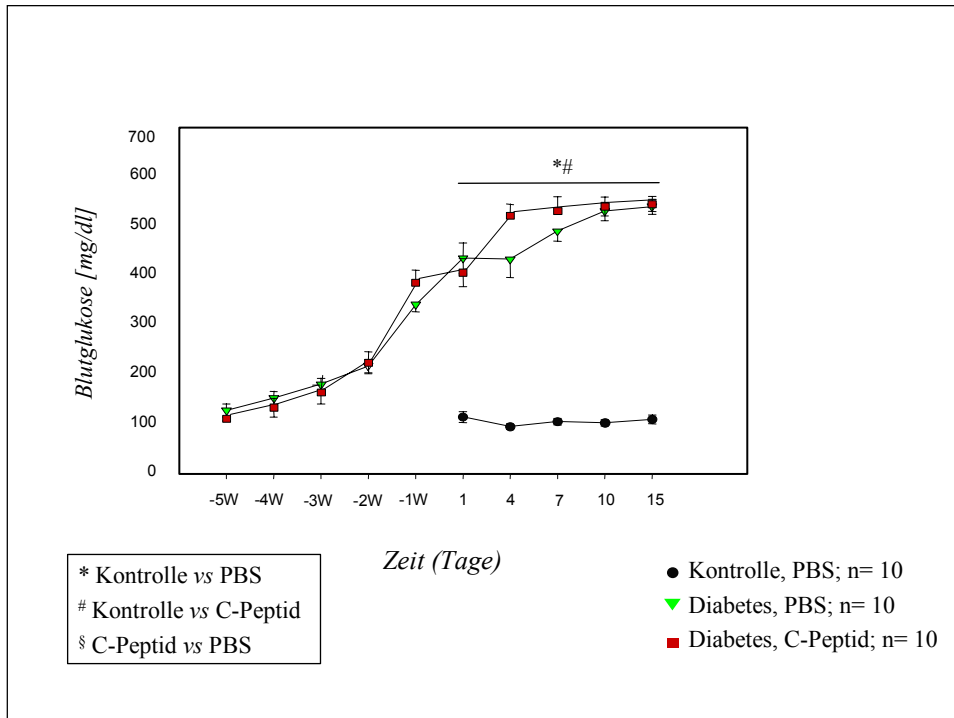


Abb. 16: Entwicklung des Blutzuckers im Versuchsprotokoll

3.2 DIE INJEKTION VON C-PEPTID

Über den gesamten Beobachtungszeitraum wurden bei den subkutanen Injektionen von C-Peptid keine lokalen Hautreaktionen beobachtet, welche auf einen entzündlichen Prozess oder auf nekrotische Veränderungen der Haut hinwiesen.

3.2.1 Die Entwicklung des Körpergewichtes

Das Gewicht der diabetischen Mäuse nahm in den ersten 5 Wochen nach Beginn der Streptozotizin Injektionen kontinuierlich ab. Dieser Gewichtsabfall bei diabetischen Tieren ist bekannt, daher wurden zur Diabetesinduktion relativ schwere Tiere mit einem Körpergewicht von mindestens 29 g gewählt. Eine Übersicht bezüglich des Körpergewichtes der diabetischen Mäuse gibt Abbildung 17.

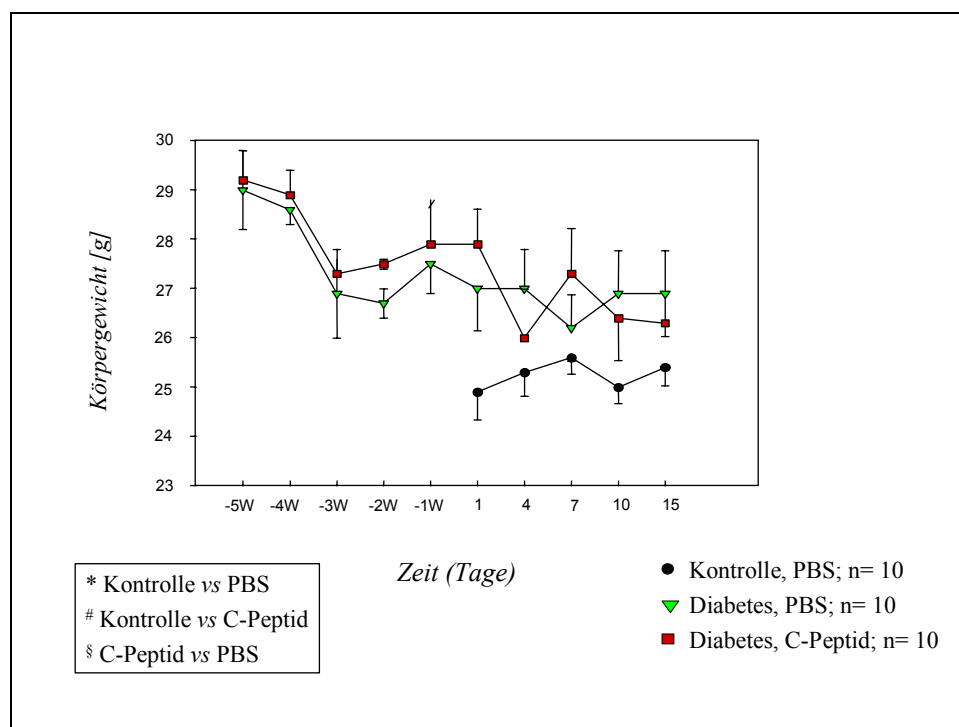


Abb.17: Entwicklung des Körpergewichtes über den gesamten Beobachtungszeitraum

3.2.2 C-Peptid Konzentrationen im Plasma

Die Untersuchung der Plasmaproben der verschiedenen Gruppen ergaben die in Tabelle 1 aufgeführten Konzentrationen von C-Peptid.

Bei der Kontrollgruppe der gesunden Tiere wurde ein Wert von 412.68 - 1195.64 pM gemessen. Bei der diabetischen Tieren der PBS Gruppe wurden Werte von 70,49 - 260,04 pM nachgewiesen. Die Werte der Kontrolltiere entsprechen den C-Peptid Konzentrationen, die von den funktionstüchtigen Langerhanszellen des Pankreas der Mäuse produziert wurden. Bei den diabetischen Tieren der C-Peptid Gruppe wurden Werte von 2216.16 - 22021.50 pM gemessen. Diese Werte ergaben sich aus dem endogenen Mäuse C-Peptid und dem injizierten Ratten II C-Peptid. Die von uns verwendete C-Peptid- Lösung hatte eine Konzentration von 12,85 μ M (40.63 μ g/ml).

	Tag 1		Tag 15	
	C-Peptid-Konzentration (pmol)	Glukose-konzentration (mg/dl)	C-Peptid-Konzentration (pmol)	Glukose-konzentration (mg/dl)
Kontrolltiere	642 \pm 377	115 \pm 11	493 \pm 290	108 \pm 13
Diabetische Tiere (PBS)	208 \pm 122	436 \pm 31	107 \pm 63	564 \pm 27
Diabetische Tiere (C-Peptid)	14129 \pm 8311	407 \pm 28	10220 \pm 6012	572 \pm 37

Tabelle 1: Vergleich der Versuchsgruppen in Bezug auf die C-Peptid Konzentration im Plasma in pmol und die Blutzuckerkonzentration in mg/dl

3.3 INTRAVITALMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN

3.3.1 Beurteilung der Wundgröße

Die Wunden der Kontrolltiere waren 15 Tage nach der Wundsetzung verschlossen ($0.1 \pm 0.01 \text{ cm}^2$).

Bei den diabetischen Gruppen konnte man eine im Vergleich zu den gesunden Tieren verzögerte Wundheilung beobachten. Die Wundfläche war ab Tag 7 bis Tag 15 in beiden diabetischen Gruppen im Mittel signifikant größer, als die Wundfläche der Kontrolltiere.

Zwischen den Wunden der C-Peptid Gruppe und der PBS Gruppe wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt (vgl. Abb. 19).

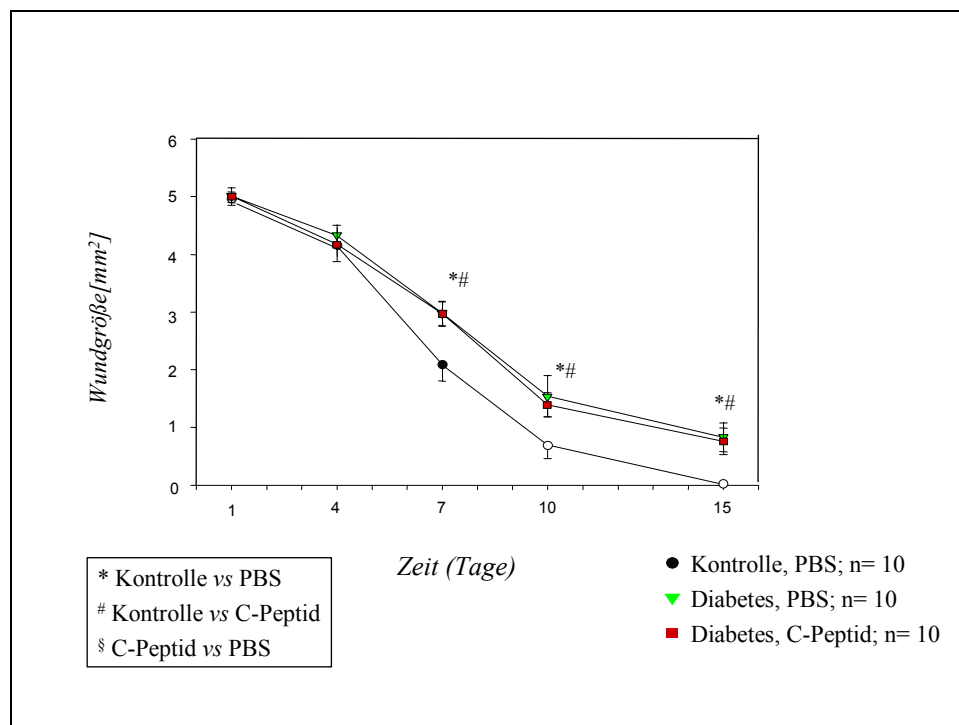


Abb. 19: Entwicklung der Wundgröße über den gesamten Beobachtungszeitraum

3.3.2 Die mikrozirkulatorischen Parameter

3.3.2.1 Durchmesser der Venolen

Am vierten Tag nach der Wundsetzung konnte man bei allen Gruppen einen leichten Anstieg der Durchmesser der Venolen erkennen. Ein statistisch signifikanter Unterschied innerhalb der Gruppen war nicht nachzuweisen. Am Tag 10 konnte man bei beiden diabetischen Gruppen eine leichte Verringerung der Durchmesser beobachten. Eine Übersicht gibt Abbildung 20.

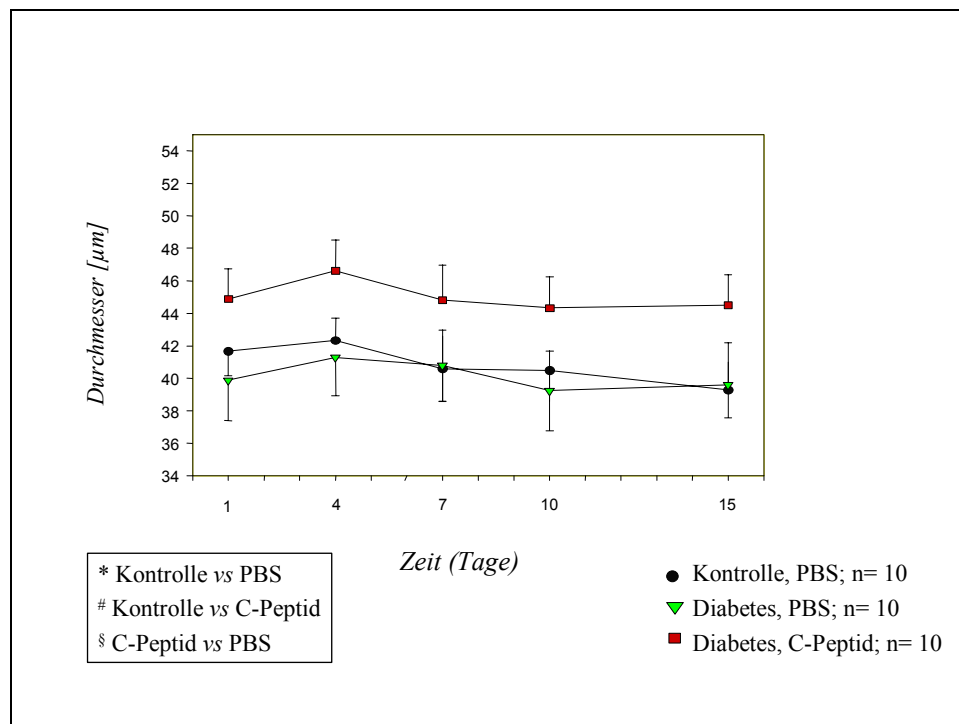


Abb. 20: Durchmesser der Venolen

3.3.2.2 Durchmesser der Arteriolen

Auch der Arteriolendurchmesser vergrößerte sich am 4. Tag nach der Wundsetzung. Am Tag 7 des Protokolls war ein Abfall des Arteriolendurchmessers der Gesunden Tiere zu beobachten, während bei den diabetischen Gruppen keine Veränderung zu erkennen war. In Abbildung 21 ist der Arteriolendurchmesser im Verlauf der Versuchstage dargestellt.

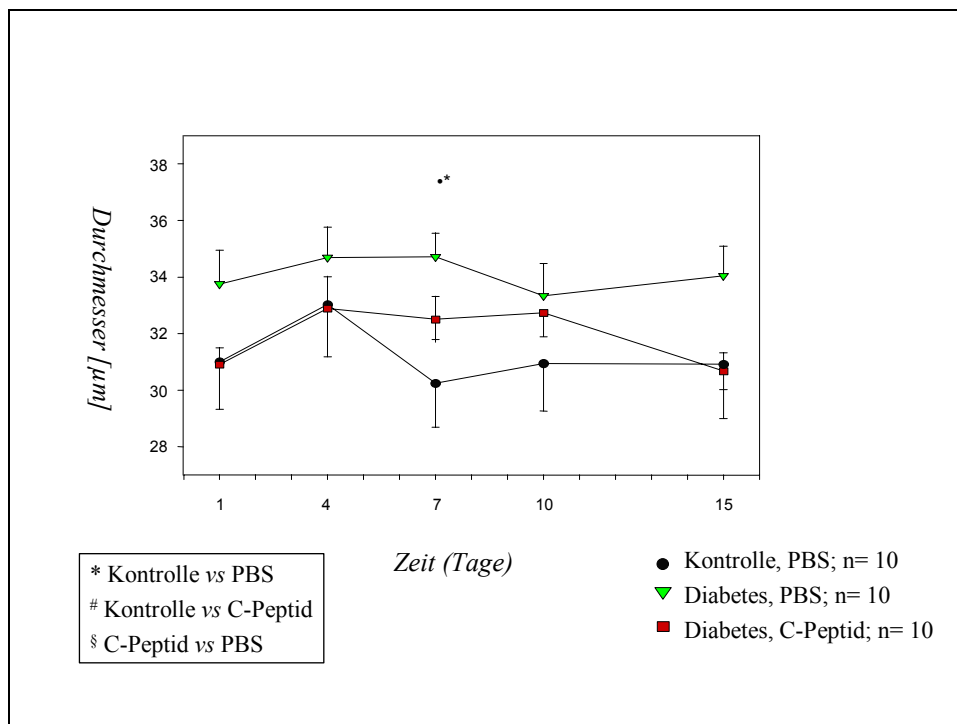


Abb. 21: Durchmesser der Arteriolen

3.3.2.3 Mittlere venöse Erythrozytenflußgeschwindigkeit (VRBCV)

Die VRBCV war bei den gesunden Kontrolltieren zu allen Zeitpunkten der Messung höher als bei den beiden diabetischen Gruppen. Es wurden über den gesamten Beobachtungszeitraum jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede innerhalb der Gruppen deutlich. Abbildung 22 gibt eine Übersicht über den Verlauf der Erythrozytengeschwindigkeit über den gesamten Versuchszeitraum.

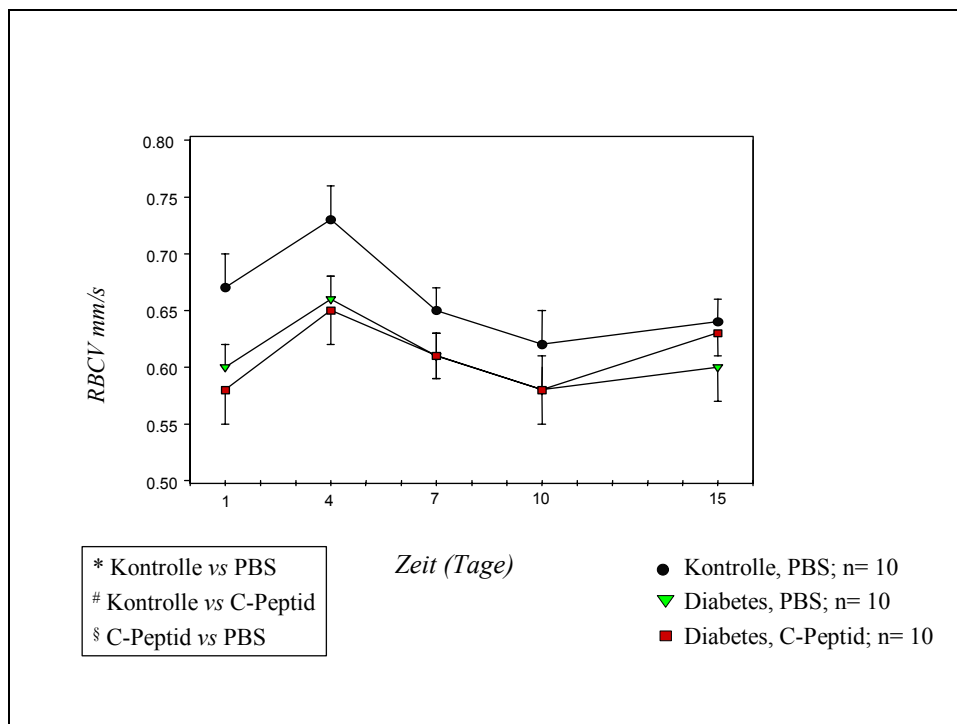


Abb.22: Erythrozytenflußgeschwindigkeit in den Venolen

3.3.2.4 Mittlere arteriöle Erythrozytenflußgeschwindigkeit (ARBCV)

Die arterielle Erythrozytenflußgeschwindigkeit war zu allen Zeitpunkten bei der gesunden Kontrollgruppe signifikant höher im Vergleich zu der mit PBS behandelten diabetischen Gruppe (vgl. Abbildung 23). Bei den mit C-Peptid behandelten Tieren zeigte sich ein Trend mit höheren Werten der ARBCV im Vergleich zu den mit PBS behandelten diabetischen Mäusen.

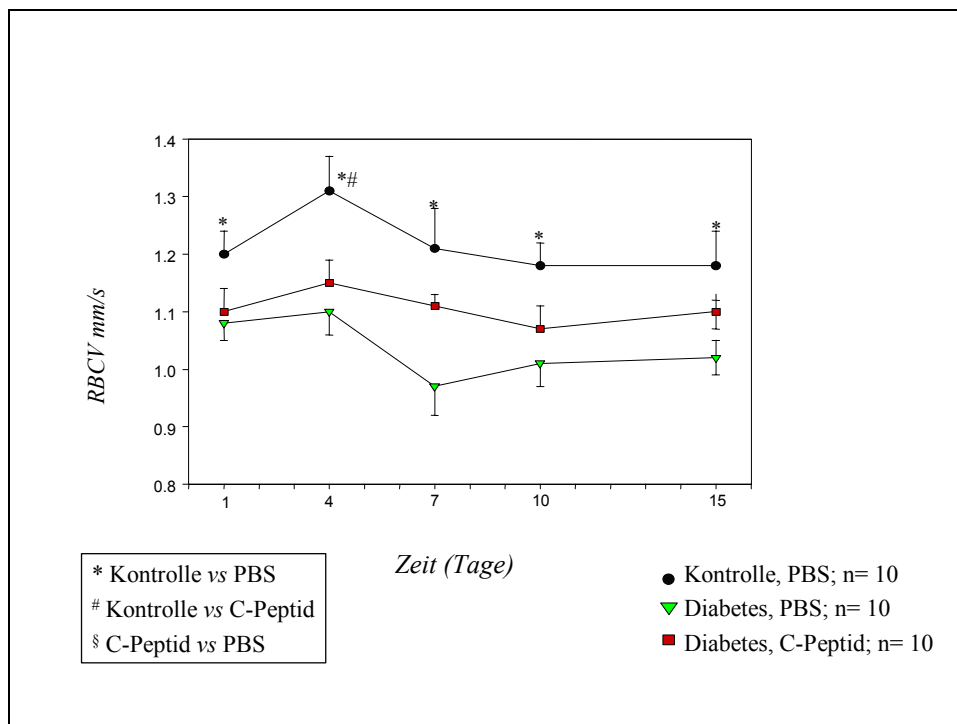


Abb. 23: Erythrozytenflußgeschwindigkeit in den Arteriolen

3.3.2.5 Funktionelle Kapillardichte (FCD)

Bei den gesunden Tieren stieg die FCD von Tag 4 bis Tag 7 nach der Wundsetzung plateauförmig auf ein Maximum an. In den beiden diabetischen Gruppen wurde diese Zunahme nicht beobachtet. Abbildung 24 zeigt den Verlauf der FCD für alle drei Tiergruppen.

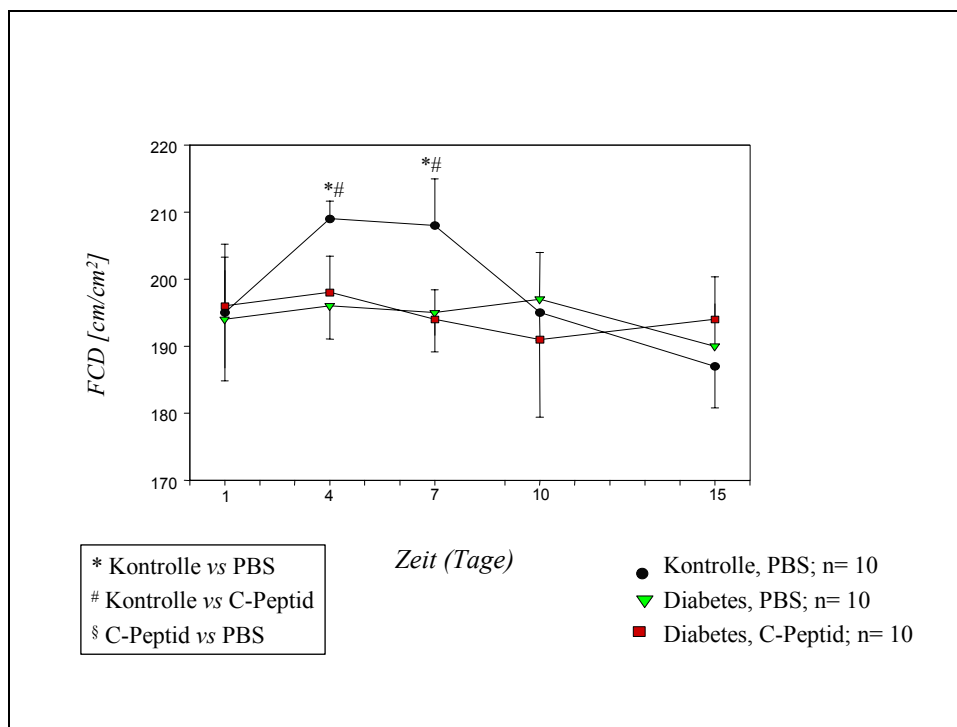


Abb. 24: Funktionelle Kapillardichte im Verlauf

3.3.2.6 Venöse Extravasation des Plasmamarkers FITC-Dextran (MG 150000)

Im Vergleich zu den gesunden Tieren war die venöse Extravasation bei den diabetischen Tieren erhöht. Am Tag 4 nach der Wundsetzung wurde in allen Gruppen ein deutlicher Anstieg der venösen Extravasation beobachtet, wobei der Austritt des Plasmamarkers in den beiden diabetischen Gruppen markanter war. An den Tagen 4, 7 und 10 erkannte man einen signifikanten Unterschied zwischen der PBS Gruppe und der gesunden Kontrolle. An den Tagen 1 und 10 konnte ein Unterschied zwischen der C-Peptid- und der gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Es wurden jedoch keine Unterschiede zwischen den beiden diabetischen Gruppen bezüglich der Extravasation beobachtet.

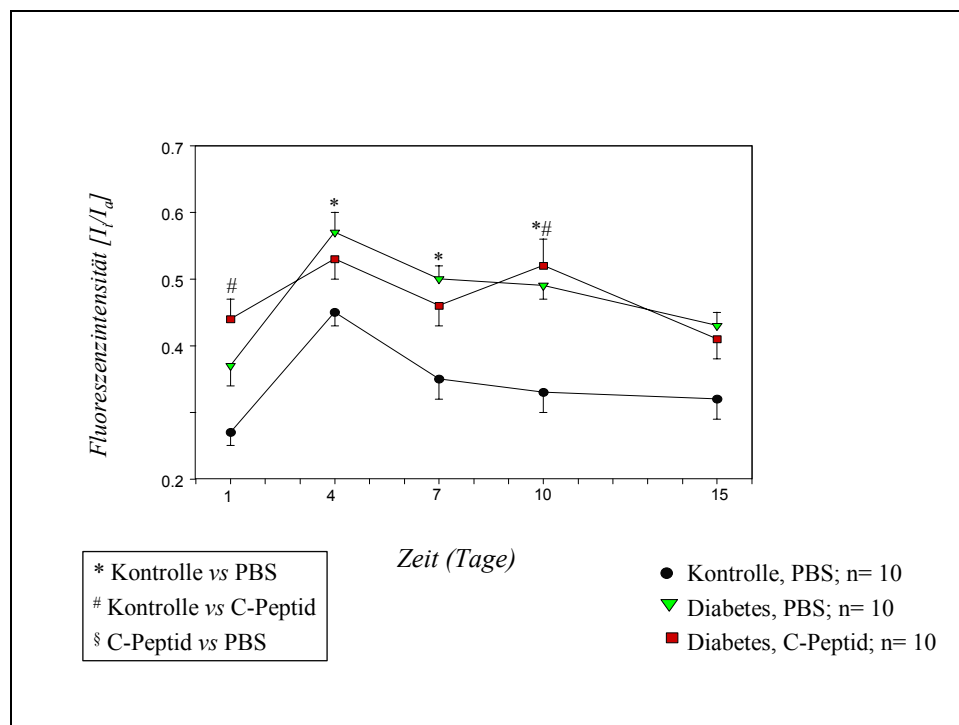


Abb. 25: Diffusion des Plasmamarkers aus den Venolen

3.3.2.7 Arteriöle Extravasation des Plasmamarkers FITC-Dextran (MG 150000)

Auch hier war die arteriöle Extravasation höher bei den beiden diabetischen Gruppen verglichen mit der gesunden Kontrolle. Nach Wundsetzung zeigte sich wieder bei allen Gruppen eine vermehrte Extravasation, wobei die beiden diabetischen Gruppen auch hier eine signifikant höhere Extravasation als die Kontrollen zeigten. Ein deutlicher Abfall lag bei den beiden diabetischen Gruppen am Tag 7 vor, wohingegen bei der gesunden Kontrolle der Abfall erst am Tag 10 stattfand (vgl. Abbildung 26).

Signifikante Unterschiede waren zu erkennen bei beiden diabetischen Gruppen an den Tagen 4 und 10 im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Ein Unterschied zwischen der mit C-Peptid behandelten Gruppe und der PBS- Gruppe war jedoch nicht nachzuweisen.

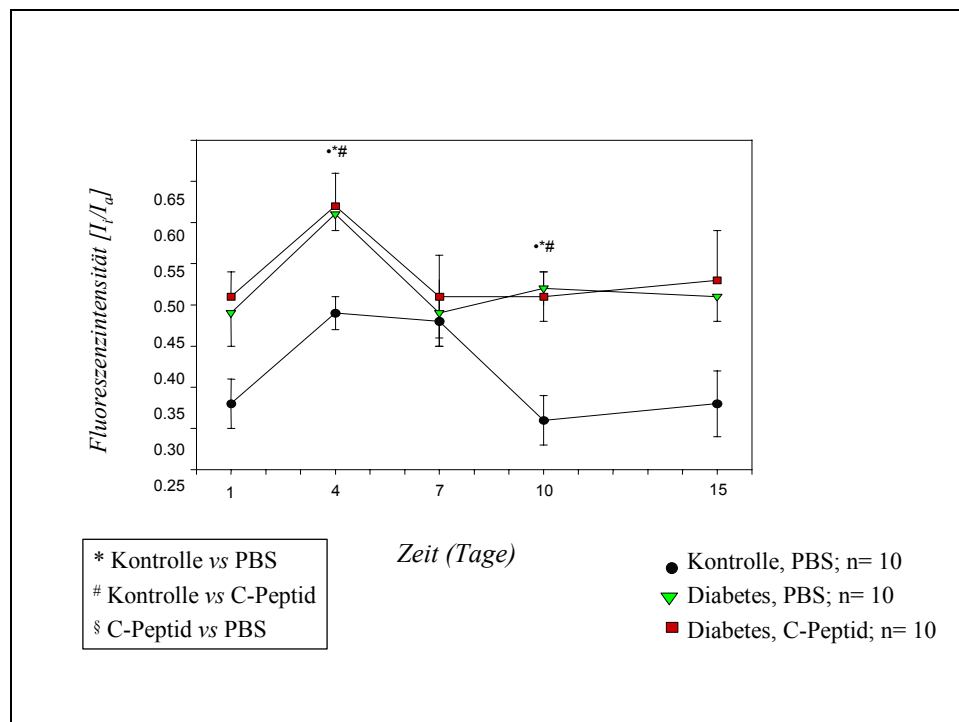


Abb. 26: Arteriöle Extravasation

3.3.2.8 Anzahl der adhärenen Leukozyten in den Venolen

Während am Tag 4 nach der Wundsetzung in allen Gruppen ein Anstieg der anhaftenden Leukozyten zu erkennen war, war am Tag 7 bei allen Tieren wieder ein Abfall zu beobachten. In der C-Peptidgruppe stieg die Zahl der adhärenen Leukozyten nach dem Abfall am Tag 7 wieder kontinuierlich bis zum Ende des Versuchsprotokolls an. Am Tag 15 war zwischen der C-Peptid Gruppe und der PBS-Gruppe ein signifikanter Unterschied in der Zahl der adhärenen Leukozyten zu erkennen.

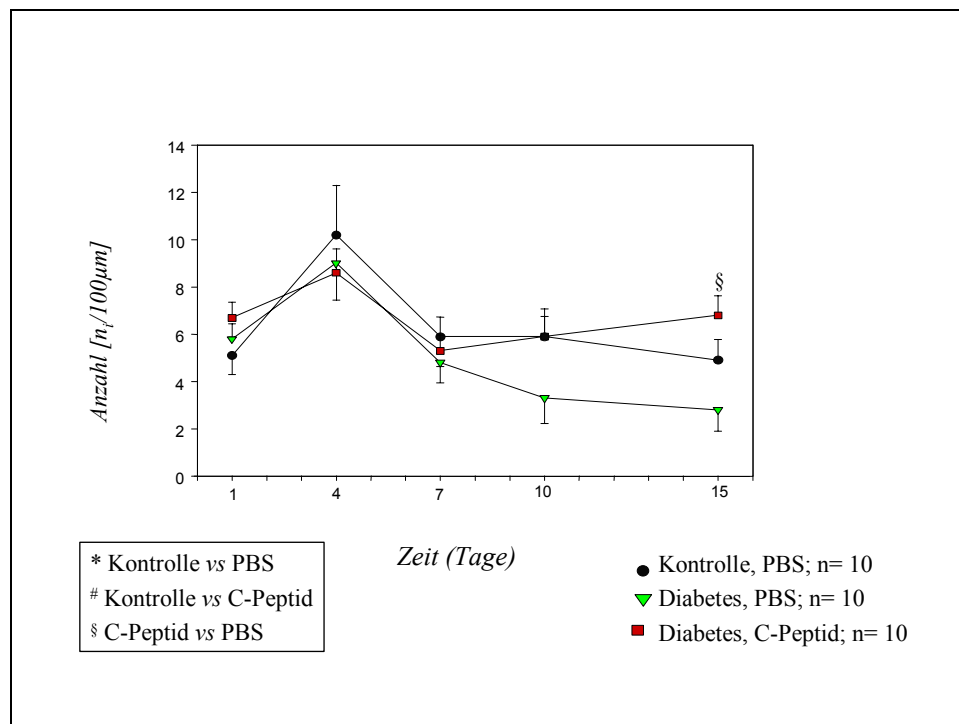


Abb. 27: Adhärenente Leukozyten in den Venolen

3.4 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Die systemische Gabe von C-Peptid zeigte keinen Einfluss auf die Wundheilung diabetischer Mäuse.

Die Erythrozytenfließgeschwindigkeit war in der Haut gesunder Kontrolltiere höher als in der Haut diabetischer Tiere. Eine, im Vergleich zu den mit PBS behandelten Tieren, erhöhte Erythrozytenfließgeschwindigkeit fand sich darüber hinaus bei diabetischen Tieren, die mit C-Peptid behandelt wurden.

Bei diabetischen Tieren konnte eine höhere Extravasation von FITC-Dextran beobachtet werden. Es konnten jedoch keine Unterschiede zwischen den beiden diabetischen Gruppen nachgewiesen werden.

Am Tag 15 nach der Wundsetzung konnte eine signifikant ($p < 0.05$) erhöhte Leukozyten-Endothelinteraktion, erkennbar am Anstieg der adhärenenten Leukozyten bei den diabetischen Tieren der C-Peptid-Gruppe beobachtet werden.

Abgesehen von dem signifikanten Anstieg der adhärenenten Leukozyten in den Venolen der mit C-Peptid behandelten Tiere, konnten keine Veränderungen der Wundheilung oder der Mikrozirkulation als Folge der C-Peptid-Behandlung verzeichnet werden.

4 DISKUSSION

4.1 PROBLEMSTELLUNG

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, die pathophysiologischen Effekte von C-Peptid auf die Wundheilung diabetischer Mäuse zu untersuchen. Dabei wurden die Auswirkungen auf die Mikrozirkulation evaluiert.

Die Studie hat gezeigt, dass systemisch verabreichtes C-Peptid bei, durch Streptozotozin-induziert diabetischen Mäusen keinen Einfluss auf die Wundheilung hatte. Es konnte lediglich ein schwacher Effekt auf die ARBCV sowie eine vermehrte Leukozyten-Endothelinteraktion nachgewiesen werden.

C-Peptid galt lange Zeit als biologisch inerte Substanz. Untersuchungen der letzten Jahre ergaben jedoch, dass C-Peptid biologisch aktiv ist und sogar einen positiven Effekt auf pathophysiologische Prozesse bei Typ I Diabetes Patienten hat (20;23;36;73). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass C-Peptid die glomeruläre Hyperfiltration bei Typ I Diabetikern vermindern sowie deren retinale Blut-Barriere-Funktion verbessern konnte (40;42). In vitro Studien am menschlichen Skelettmuskel gaben Hinweise darauf, dass C-Peptid den Kohlenhydratstoffwechsel durch einen von Insulinrezeptoren unabhängigen Glukosetransport verbessern könnte (73). Lindström et al. untersuchten die Perfusion der Skelettmuskulatur von Rattenhinterbeinen nach Applikation von C-Peptid. Dabei zeigte sich eine Vasodilatation hervorgerufen durch Effekte von C-Peptid auf die glatte Gefäßmuskulatur (74). Auch ein erhöhter Glukoseverbrauch sowie eine verbesserte autonome Nervenfunktion wurden sowohl im Tierversuch bei diabetischen Ratten, durch Streptozotozin induziert, als auch bei diabetischen Patienten. verzeichnet (45;75;76).

Eine Langzeitapplikation von C-Peptid bei Typ I Diabetikern ergab eine verbesserte Nierenfunktion mit verminderter Mikroalbuminurie sowie eine Verbesserung der autonomen und sensorischen Neuropathie durch eine erhöhte respiratorische Herzfrequenz-Variabilität sowie der Temperaturempfindungsschwelle (42).

Sowohl *in vitro*- als auch *in vivo*-Ergebnisse weisen darauf hin, dass C-Peptid

auch eine Rolle bei der Insulinsekretion spielt. Forst et al. untersuchten die biologische Aktivität von C-Peptid in menschlicher Haut. Sie konnten nachweisen, dass eine Substitutionstherapie mit C-Peptid bei Typ I Diabetikern einen Anstieg des Blutflusses bewirkte (46). Der genaue Funktionsmechanismus ist bislang noch ungeklärt. Man geht aber davon aus, dass C-Peptid über eine Stimulierung der Natrium-Kalium-ATPase wirkt (77;78). Bei Untersuchungen des trainierenden Unterarms im Skelettmuskel wurde ein durch C-Peptid erhöhter Blutfluss sowie ein erhöhter Glukose- und Sauerstoffverbrauch verzeichnet (22). Diese Beobachtungen möglicher biologischer Aktivitäten von C-Peptid sind von großem Interesse bezüglich der Spät komplikationen des Diabetes mellitus. So könnte das Fehlen von C-Peptid von Bedeutung sein für die diabetischen Spät komplikationen, wie z. B. die diabetische Neuropathie (45). Eines der schwerwiegendsten Probleme diabetischer Patienten stellt die Wundheilungsstörung dar. Es ist bekannt, dass bei Diabetikern die Mikrozirkulation in der Haut deutlich reduziert ist, was mit einem erhöhten Risiko für chronische Hautulzera vergesellschaftet ist (16) (3).

Von besonderem Interesse war der Einfluss von C-Peptid auf die verschiedenen mikrozirkulatorischen Parameter *in vivo*, welche mittels intravitalmikroskopischer Analyse gemessen werden können. Derartige Untersuchungen über den direkten Einfluss von systemisch verabreichtem C-Peptid auf die Mikrozirkulation von diabetischen Wunden wurden bislang noch nicht durchgeführt.

Als etabliertes Modell wurde die Wunde am Ohr der haarlosen Maus gewählt. Dies ermöglichte Untersuchungen über einen längeren Zeitraum am selben Tier und somit auch die Erfassung des zeitlichen Verlaufs der durch C-Peptid induzierten Veränderungen.

4.2 MATERIAL UND METHODIK

4.2.1 Diskussion des Modells

Eine intakte Mikrozirkulation ist für die ungestörte Wundheilung essentiell. Einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis der Pathophysiologie der Wundheilung liefert die Kenntnis über die kutane Mikrozirkulation. Die Auswahl geeigneter tierexperimenteller Modelle zur Untersuchung der kutanen Mikrozirkulation *in vivo* ist

gering.

Neben Modellen unter Verwendung von Rückenhautkammern bei verschiedenen Kleintieren (79-82), Kaninchenohrkammern und dem Modell des Fledermausflügels, gibt es das Ohr der haarlosen Maus als Modell zur Untersuchung der Haut (83;53). Die Verwendung des Fledermausmodells ist in den Hintergrund getreten, nicht nur aufgrund der schwierigen Haltung sondern auch wegen einer sehr geringen Kompatibilität der Fledermaushaut mit der Haut des Menschen.

Die Untersuchungen unter Verwendung von Hamsterrückenhautkammern ermöglichen eine Beobachtung über einen langen Zeitraum und sind daher gut geeignet zur längeren Beurteilung pathophysiologischer Prozesse (84).

Der Nachteil dieses Modells ist allerdings der beträchtliche Einfluss des chirurgischen Eingriffs auf die Mikrozirkulation. Auch kann die Kammer selbst einen chronischen Reiz darstellen, der das Verhalten der Leukozyten im mikrovaskulären Gefäßbett beeinflusst.

Beim Modell der haarlosen Maus sind keine traumatisierenden Eingriffe notwendig, welche die Mikrozirkulation wesentlich beeinflussen könnten. Das Anbringen der Halteschlaufen am zu untersuchenden Ohr sowie Wundsetzung und Injektionen sind die einzigen notwendigen Traumata. Weitere Vorteile dieses Modells sind:

- Versuche über einen langen Zeitraum
- einfache Applikation von Medikamenten oder Plasmamarkern subkutan, intraperitoneal oder intravenös
- durch Inzucht und genetisches Mapping geringe Variabilität zwischen den Tieren
- einfache und kostengünstige Tierhaltung

Neben der Messung der mikrozirkulatorischen Parameter, ist auch die Beobachtung der Wundgröße möglich.

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse ist aufgrund der strukturellen und funktionellen Unterschiede zwischen der Haut des Menschen und dem Mäuseohr eingeschränkt. Dennoch ermöglicht es, wichtige Informationen bezüglich der Wundheilung im Rahmen von *in vivo* Untersuchungen zu erhalten.

4.2.1.1 Das Ohr der haarlosen Maus als Wundheilungsmodell

Das von Bondar et al. etablierte Wundmodell am Ohr der haarlosen (SKH1-hr) Maus wurde entwickelt, um die Mikrozirkulation im Rahmen der Wundheilung quantifizieren zu können. Dieses Modell ermöglicht die direkte Untersuchung des Einflusses lokal, subkutan und intravasal applizierter Therapeutika auch unter pathophysiologischen Bedingungen wie z.B. unter diabetischer Stoffwechsellage (85). Der Diabetes kann einfach und reproduzierbar durch intravenös verabreichtes Streptozotizin hervorgerufen werden. Zusätzlich kann als valider Parameter die Wundfläche als Maß für die Reepithelisierung bestimmt werden.

Bisher wurden noch keine Untersuchungen zur Wirkungsweise von C-Peptid am Ohr der haarlosen Maus durchgeführt.

4.2.2 Meßmethoden

4.2.2.1 Funktionelle Gefäßdichte

Zur Bestimmung der funktionellen Gefäßdichte wurden alle von Erythrozyten perfundierten Kapillaren innerhalb eines Beobachtungsareals (ROI= Region of interest) gemessen. Es wurde eine Videoaufnahme angefertigt, die dann ein stehendes Bild auf dem Computerbildschirm ermöglichte. Auf diesem Bild können alle perfundierten Gefäße im Gegensatz zu den nicht perfundierten Gefäßen nachgezeichnet werden. Die Gefäßdichte wird als Länge pro Fläche in ($\text{cm} \times \text{cm}^{-2}$) bzw. (cm^{-1}) angegeben. Die meisten Fehler können bei dieser Methode beim Nachzeichnen der Gefäße sowie durch fehlendes Erkennen der Gefäße durch schlechte Bildqualität auftreten.

Der intraindividuelle Fehler liegt bei dieser Methode bei 10 % und interindividuell bei 70 % (67). Daher erfolgte die gesamte Auswertung in dieser Studie vom selben Untersucher, so dass der interindividuelle Fehler hier nicht zum Tragen kam und nicht berücksichtigt werden musste.

Wichtig für die exakte Auswertung ist vor allem eine gute Bildqualität der Aufnahmen. Neben geringsten Traumatisierungen sorgte auch die diabetische Stoffwechsellage für eine Verschlechterung der Bildqualität. Das äußerte sich in einer vermehrten Extravasation des Plasmamarkers FITC-Dextran, der durch gesteigerte Fluoreszenz

des Interstitiums den Kontrast zwischen intravasalem und extravasalem Raum abschwächte. Bei den gesunden Kontrolltieren trat dieses Problem in der Regel nicht auf (vgl. Abbildungen 28 und 29).



Abb 28: Gesundes Tier. Arteriolen und Venolen heben sich deutlich ab vom dunklen Hintergrund (Vergrößerung x 533)

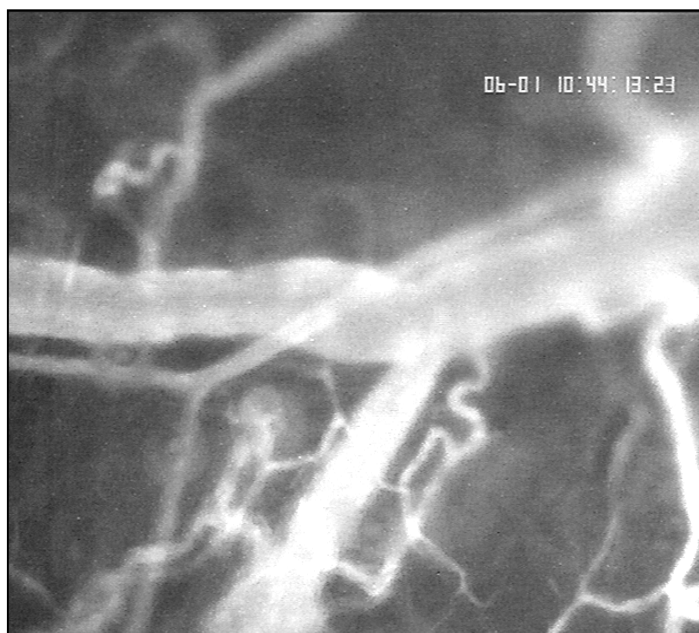


Abb. 29: Tier mit diabetischer Stoffwechsellage. Der Plasmamarker ist in das Interstitium diffundiert und schwächt den Kontrast ab. (Vergrößerung x 533)

4.2.2.2 Gefäßdurchmesser

Die Berechnung der Gefäßdurchmesser wurde mit dem Bildverarbeitungssystem *Cap Image*TM durchgeführt. Hierbei war zu berücksichtigen, dass die Markierungspunkte im Prinzip auf einer beide Gefäßwände im rechten Winkel schneidenden Linie liegen sollten. Da es hier zu Verschiebungen kam, resultierte eine geringe Vergrößerung des Durchmessers. Zur Minimierung dieses Fehlers wurden je drei Messungen des selben Durchmessers vorgenommen. Die intraindividuelle Fehlerbreite lag hier nur noch bei $\pm 5 \%$ und war somit gering.

4.2.2.3 Erythrozytenflußgeschwindigkeit

Die Bestimmung der Erythrozytenflußgeschwindigkeit erfolgte nach der Line-Shift-Diagramm-Methode (67). Mit dieser Methode nach Zeintl ist es möglich, die Geschwindigkeit der Erythrozyten im Gefäß zu messen. Anspruchsvoll ist insbesondere die Messung höherer Geschwindigkeiten, da hierzu der Abstand zwischen dem stromauf- und stromabwärts liegenden Fenster vergrößert werden muss. Sind die beiden Fenster eng beieinander, ist die Korrelation der durch den Erythrozytenfluß erzeugten Videomuster extrem hoch. Je weiter die beiden Fenster jedoch voneinander entfernt sind, umso häufiger kommt es durch zufällige Veränderungen im Strömungsmuster zur Verminderung der Korrelation. Die maximal messbare Geschwindigkeit war dabei durch die Bildfrequenz des Videorekorders begrenzt und lag bei der verwendeten Messeinheit bei 2,5 mm/s. Die intraindividuelle Fehlerbreite wurde mit $\pm 20 \%$ ermittelt und lag somit höher als bei der Auswertung der Gefäßdurchmesser. Aufgrund dieser Streuung, wurden für jedes Gefäß zwei Messungen durchgeführt, deren Mittelwert in die Auswertung einging.

4.2.2.4 Planimetrie der Wunde

Zur Erfassung der Wundfläche als Maß der Wundheilung gibt es eine Reihe von verschiedenen Methoden. Dazu gehören neben Vermessungen von histologischen Schnitten der Wunden (86) auch die Auswertung von manuell nachgezeichneten Wunden auf Folien. Dabei wird auf den Computerbildschirm, der die Übersichtsaufnahme der Wunde zeigt, eine Klarsichtfolie gehalten. Mit einem Stift kann der Wundrand nachgezeichnet werden (87). Darüber hinaus gibt es die Möglichkeit der Fotografie (88).

In unserem Modell verwendeten wir die Methode der computerassistierten Planimetrie. Diese Methode erwies sich als genau und zuverlässig. Der Wundrand, der sich scharf abzeichnete, wurde exakt aufgezeichnet. Zudem konnte die Wundgröße im Verlauf der Wundheilung zu jedem beliebigen Zeitpunkt gemessen werden.

4.2.3 Die Injektionen

Über den gesamten Versuchszeitraum musste den einzelnen Versuchstieren wiederholt Streptozotozin (STZ), FITC-Dextran und Rodamin 6G intravenös injiziert werden.

Zur Induktion des Diabetes wurden im 2-tägigen Intervall dreimal 60 mg/kg STZ-Injektionen intravenös in die Schwanzvene verabreicht. Tiere, die einen Blutglukosespiegel zwischen 16.6 und 33.2 mmol/l erreicht hatten wurden für die Studie akzeptiert und gingen sofort in das Versuchsprotokoll ein. Vor jeder Videoaufnahme der Mikrozirkulation wurde der Plasmamarker intravenös gespritzt. Jedes Tier hat aber nur vier Schwanzvenen als Applikationsort zur Verfügung. Eine erhöhte Anzahl an Injektionen erschwerte die Applikation der Substanzen. Alternativ stand die Punktion der Vena radialis zu Verfügung.

4.3 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

4.3.1 Induktion des Diabetes mellitus

Die Induktion des Diabetes mellitus wurde mittels wiederholter Gabe von Streptozotozin mit einer Dosis von 60 mg/kg Körpergewicht erreicht. Die Injektionen erfolgten intravenös in die Schwanzvene. Um die wenigen zur Verfügung stehenden Venen, die für Punktionen und Injektionen geeignet waren, zu schonen, wählten wir eine Methode zur Induktion des Diabetes bei der möglichst wenige Applikationen notwendig waren. Die Induktion des Diabetes wurde 5 Wochen vor Versuchsbeginn eingeleitet. Die Blutglukosekonzentration wurde am 5. Tag nach der 3. Injektion gemessen. Tiere mit einem Blutzuckerwert von 16.6 und 33.2 mmol/l wurden in den Versuch aufgenommen. Nach 5 Wochen hatten alle Tiere einen manifesten Diabetes entwickelt. Ein anderes Modell wurde von Like und Rossini 1976 als Multiple-Low-

Dose-Streptozotozin-Modell entwickelt, bei dem insgesamt 5 Dosen geringerer Konzentration (40 mg/kg Körpergewicht) an 5 aufeinanderfolgenden Tagen gegeben werden (89).

4.3.2 Wundheilung

Bei der Auswertung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen zeigt sich, dass die Applikation von C-Peptid bei diabetischen haarlosen Mäusen keine positive oder stimulierende Wirkung auf die Wundheilung hatte. Auch konnte kein Effekt von C-Peptid auf den Blutglukosewert festgestellt werden. Es zeigten sich keine Unterschiede im Hinblick auf die Blutglukosewerte zwischen den diabetischen Tieren der PBS- und der C-Peptid-Gruppe.

4.3.3 Serum

In Serumkontrollen zur Bestimmung der Konzentration von C-Peptid konnten signifikant erhöhte Werte bei den Tieren festgestellt werden, denen C-Peptid appliziert worden war. Hier konnte eine systemische Anreicherung von C-Peptid durch die vorausgegangene Applikationen des C-Peptids nachgewiesen werden.

In vitro-Studien zeigten, dass C-Peptid den Kohlenhydratstoffwechsel regeneriert und unabhängig von Insulinrezeptoren den Glukosetransport stimuliert (73). In unseren *in vivo*-Messungen ergaben sich bei der C-Peptid-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Unterschiede in Hinblick auf den Blutzuckerwert.

4.3.4 Mikrozirkulation

Um den Einfluss von C-Peptid auf die Hautmikrozirkulation zu untersuchen, verwendeten wir die Methode der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie, mit der es möglich ist, die Hautgefäße der haarlosen Maus zu visualisieren und zu quantifizieren.

Lindström et al. wiesen nach C-Peptid Gabe im Skelettmuskel des Hinterbeines von Ratten eine Vasodilatation sowie eine Verbesserung der funktionellen Kapillardichte nach (74). Eine klinische Studie ergab, dass sich nach einer C-Peptid-Infusion sowohl der Blutfluss, als auch die kapilläre Diffusionskapazität im trainierenden Unterarm von Diabetikern verbesserten (22). In einer weiteren Studie wurde der

Effekt von C-Peptid auf die Mikrozirkulation untersucht, wobei die glomeruläre Hyperfiltration gesenkt werden konnte (22). In diesem Zusammenhang wird diskutiert, dass der positive Effekt von C-Peptid auf seiner Fähigkeit beruht, die verminderte Verformbarkeit von Erythrozyten bei Typ I Diabetikern zu verbessern (90).

Basierend auf den Ergebnissen der oben genannten Studien wird angenommen, dass das Fehlen von C-Peptid bei Diabetikern eine Rolle bei der Entwicklung von Spätkomplikationen spielen könnte. Dazu gehören die diabetische Neuropathie (45) und vor allem Wundheilungsstörungen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Mikrozirkulation der Haut bei Diabetikern vermindert ist, was einen entscheidenden Faktor im Zusammenhang mit der Entstehung von Hautulzera darstellt (16;91;92).

In unserer Studie wurden die Auswirkungen von systemisch verabreichtem C-Peptid auf die Wundheilung diabetischer Mäuse untersucht. Ein positiver Einfluss von C-Peptid auf die Wundheilung konnte nicht beobachtet werden, was im Gegensatz zu den vorbeschriebenen Untersuchungen stand.

In Hinblick auf die funktionelle Kapillardichte zeigten sich bei den beiden diabetischen Gruppen keine Unterschiede. Während sich bei den gesunden Tieren im Laufe des Beobachtungszeitraums zwischen 4. und 7. Tag nach Wundsetzung ein plateauförmiges Maximum ergab, war bei den diabetischen Tieren kein positiver Effekt von C-Peptid zu erkennen.

Auch bei der Untersuchung der venolären und arteriolären Gefäßdurchmesser hatte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen gezeigt. Die Blutflussgeschwindigkeit in den Arteriolen bei den mit C-Peptid behandelten diabetischen Tieren war nur leicht erhöht. Hingegen hat eine Studie von Forst und Mitarbeitern einen positiven Einfluss von C-Peptid auf den Blutfluss ergeben: mittels Videokapillaroskopie wurde am Nagelfalz ein Anstieg der Blutflussgeschwindigkeit nach C-Peptid-Infusion bei Diabetikern gemessen (46).

Der Austritt des Plasmamarkers aus den Venolen und Arteriolen war von der C-Peptid-Applikation unabhängig. Auffällig war eine erhöhte Zahl von rollenden Leukozyten an den Endothelzellen der Venolen der diabetischen Mäuse, die C-Peptid erhalten hatten. Dieser Trend begann an Tag 10. Zusätzlich zeigte sich ein Anstieg der adhärenenten Leukozyten bei der C-Peptid-Gruppe, nach einem anfänglichen Absinken am Tag 7. Am Tag 15 war die Zahl der rollenden Leukozyten

gegenüber der PBS-Gruppe signifikant erhöht. In einer Studie von Fortes et al. ist während intravitalmikroskopischer Aufnahmen des Cremastermuskels gezeigt worden, dass bei diabetischen Ratten die Zahl der rollenden Leukozyten im Vergleich zu gesunden Tieren vermindert ist (15). Die Anzahl der Leukozyten im Blut von diabetischen Tieren war im Vergleich zu gesunden Tieren nicht unterschiedlich. Zudem konnte beobachtet werden, dass nach der Induktion einer Entzündungsreaktion die Zahl der Leukozyten im perivaskulären Entzündungsgewebe der gesunden Tiere signifikant zunahm, die Zahl der rollenden Leukozyten intravaskulär parallel dazu abnahm. Bei den diabetischen Tieren hingegen konnte keine Akkumulation der Leukozyten im Entzündungsgewebe nachgewiesen werden. Die Zahl der rollenden Leukozyten im Gefäß blieb unverändert. Man könnte also annehmen, dass die verminderte Infektabwehr bei Diabetikern auf einer gestörten Leukozyten-Endothelinteraktion beruht (15;93). In der vorliegenden Arbeit haben wir erstmals den Einfluss von C-Peptid auf die Leukozyten-Endothelinteraktion der diabetischen Haut untersucht. Nach C-Peptid-Gabe konnten wir eine vermehrte Leukozyten-Endothelinteraktion bei den diabetischen Tieren nachweisen. Um die genaue Rolle von C-Peptid im Rahmen von Entzündungen beurteilen zu können, sind weiterführende Experimente erforderlich.

4.3.5 Probleme des Modells

In dem von uns eingesetzten Tiermodell wurde die diabetische Stoffwechsellage durch Streptozotzin intravenös induziert. Als Folge wurden zwar erheblich erhöhte Blutglukosespiegel und klinische Symptome wie Gewichtsverlust und Dehydration beobachtet, jedoch konnten keinerlei Langzeitkomplikationen in so kurzer Zeit erfasst werden.

Die Bestimmung der C-Peptid-Konzentrationen im Blutplasma der Tiere ergab bei den diabetischen Tieren der PBS-Gruppe C-Peptid- im Plasma als Zeichen einer Restfunktion der durch das Streptozotzin zerstörten Beta Zellen des Pankreas. Möglicherweise waren diese endogenen C-Peptid-Konzentrationen noch ausreichend wirksam, so dass exogen zugeführtes C-Peptid keinen Effekt zeigen konnte.

Die Verwendung von Ratten-C-Peptid bei haarlosen Mäusen in der vorliegenden Untersuchung könnte die im Vergleich zu anderen Untersuchungen abweichenden

Ergebnisse erklären. Ido et al. wiesen nach, dass sich vaskuläre und neuronale Dysfunktionen verbesserten, nachdem sie Ratten humanes C-Peptid injiziert hatten. Zusätzlich hatte sich die Natrium-Kalium-abhängige Adenosintriphosphat-Aktivität im diabetischen Gewebe verbessert (21). Johansson et al. konnten im Rahmen einer klinischen Studie durch die Gabe von humanem C-Peptid bei Typ I Diabetikern den renalen Plasmafluß verbessern und die renale Hyperfiltration vermindern (40). Ein Grund für die abweichenden Ergebnisse in unserer Studie könnte sein, dass Ratten-C-Peptid bei haarlosen Mäusen keine biologische Aktivität zeigt. Das könnte daran liegen, dass die Aminosäuresequenz der C-Peptid-Moleküle von haarlosen Mäusen und von Ratten wesentlich größere Unterschiede aufweist, als die Aminosäuresequenz zwischen menschlichem C-Peptid und Ratten-C-Peptid (94).

Auch eine zu niedrige Dosis von C-Peptid könnte die Ursache für ein negatives Ergebnis sein. In einer Studie von Ido und Mitarbeitern wurde dieselbe Methode zur Induktion des Diabetes mit Streptozotocin eingesetzt und damit bei Ratten positive Ergebnisse in Bezug auf die Prävention von neuronalen und vaskulären Störungen erreicht (21). Die Autoren verwendeten jedoch eine höhere Dosis von C-Peptid als in unserer Untersuchung. Es wurde eine tägliche Dosis von 260 nmol/kg Körpergewicht eingesetzt, nahezu das Vierfache der Dosis, die in unserem Modell Anwendung fand (72 nmol/kg Körpergewicht).

Möglicherweise war auch der Applikationszeitraum von 15 Tagen zu kurz um einen Einfluss auf die mikrozirkulatorischen Parameter beobachten zu können. Im Gegensatz hierzu liegen einige Kurzzeitstudien vor, die positive Ergebnisse nachweisen konnten. So konnten Johansson und Mitarbeiter durch eine Kurzzeitinfusion mit C-Peptid sowohl einen regulatorischen Einfluss auf die Nierenfunktion als auch eine Stimulation des Glukoseverbrauchs bei Typ I Diabetikern auslösen (22). Auch Ohtomo und Mitarbeiter beobachteten in einer Kurzzeitstudie, dass C-Peptid stimulierend auf die renale Natrium-Kalium-ATPase wirkt (51).

Im Rahmen einer klinischen Anwendung konnte die kombinierte Behandlung mit C-Peptid und Insulin erst nach einer Langzeitapplikation von 3 Monaten eine Verbesserung der Nierenfunktion und des autonomen Nervensystems bei Typ I Diabetikern bewirken (46).

5 ZUSAMMENFASSUNG

C-Peptid entsteht bei der Insulinsynthese. Es verbindet die A- und B-Ketten des Insulinmoleküls, um die Faltung des Moleküls zu ermöglichen. Man nahm lange Zeit an, dass C- Peptid eine biologisch inerte Substanz ist.

Sowohl *in vitro*- als auch *in vivo*-Studien zeigten, dass C-Peptid eine Bedeutung bei der Insulinsekretion hat. Die Wirkung des C-Peptids wird zum Teil über eine Stimulierung der Natrium-Kalium-ATPase erklärt. Dabei bindet das Peptid an einen G-Protein gekoppelten Oberflächenrezeptor, der eine darauffolgende Aktivierung von Calcium²⁺-abhängigen intrazellulären Signalwegen nach sich zieht. In vorangegangenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass intravenös injiziertes C-Peptid einen vermehrten Blutfluß im Skelettmuskel und in der Haut zur Folge hat. Zudem bewirkt es eine verminderte Hyperfiltration in der Niere und eine reduzierte Exkretion von Albumin im Harn. Zusätzlich wurde bei Typ I Diabetikern eine Verbesserung der Nervenfunktionen beobachtet. Die Beobachtung dieser biologischen Effekte lässt einen positiven Einfluss von C-Peptid auf die Mikrozirkulation erkennen. Es ist bekannt, dass die Mikrozirkulation der Haut bei diabetischer Stoffwechsellage signifikant vermindert ist (16;95). Dies ist eine der Hauptursachen für die Entwicklung von Wundheilungsstörungen bei Diabetes mellitus. Es besteht also die berechtigte Annahme, dass eine C- Peptid Substitution die Entwicklung von Langzeitkomplikationen bei Diabetes mellitus Typ I durch Beeinflussung der Mikrozirkulation verhindern oder zumindest verzögern könnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Effekt von C-Peptid auf die Wundheilung bei diabetischer Stoffwechsellage von Mäusen untersucht. Dabei wurden die Auswirkungen der Substanz auf die Mikrozirkulation der Wunde und Wundumgebung analysiert. Alle Versuche wurden an einem etablierten Wundmodell durchgeführt, das wiederholt und über einen längeren Zeitraum hinweg die quantitative Analyse der Mikrozirkulation mittels Intravitalmikroskopie am Versuchstier zuließ. Wir konnten erstmals einen Effekt von C-Peptid auf die Leukozyten-Endothelinteraktion bei diabetischer Stoffwechsellage nachweisen. Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um die genauen pathophysiologischen Zusammenhänge dieser Leukozyten- Endothelinteraktionen zu analysieren und die langfristige Bedeutung für die Wundheilung besonders bei

Diabetikern einschätzen zu können. Möglicherweise kann C-Peptid eine wichtige Funktion in der Prävention und Therapie von Langzeitkomplikationen des Diabetes mellitus einnehmen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Meyer-Steinegg. Kurze Geschichte der Chirurgie. 7-10. 1973. Berlin.
2. Knapp U., Hansis M. Die Wunde. Pathophysiologie- Behandlung-Komplikationen. 1-9. 1998. Bonn, Thieme Verlag.
3. Bondar I., Uhl E., Barker J.H., Galla T.J., Hammersen F., Messmer K. A new model for studying microcirculatory changes during dermal wound healing. Res. Exp. Med.(Berl.) 1991; 191: 379-388.
4. Hunt T.K. Disorders of wound healing. World J. Surg. 1980; 4: 271-277.
5. Mayer B., Roesken F., Lepper A., Wanner G. A., Menger M.D. G-CSF beschleunigt die Wundheilung bei diabetischer Stoffwechselleage. Langenbecks Arch.,1999; Suppl. 1: 319-321.
6. Arnold F., West D. Angigenesis in Wound Healing. Pharmac. Ther. 1991; 52: 407-422.
7. Struck H., Wokalek H., Schöpf E. Wundheilung. 4-14. 1987. Berlin, Springer-Verlag.
8. Huey J., Narayanan H.S., Jones K. Effect of epidermal growth factor on the synthetic activity of human fibroblasts. Bioch. Biophys. Acta 1980; 632: 227-233.
9. Johnson R.L., Ziff M. Lymphokine stimulation of collagen accumulation. J. Clin. Invest. 1976; 58: 240-252.
10. Korn J.H., Haluschka P.V., Le Roy E.C. Mononuclear cellmodulation of connective tissue function. J. Clin. Invest.1980; 65: 543-554.
11. Hunt T.K. Disorders of wound healing. World J. Surg. 1980; 4: 271-277.
12. Liebl A., Neiss A., Spannheimer A., Reitberger U., Wagner T., Gorz A. Costs of type II diabetes in Germany. Results of the CODE-2-study. Dtsch. Med. Wochenschr. 2001, 126. 585-589.

13. Schwartz S.I., Shires G.T., Spencer F.C., Daly J.M., Galloway A.C., Fischer J.E. Principles of surgery. 7, 285-295. 1999. McGraw-Hill Professional.
14. Bollinger A., Franzeck U.K. Das dicke Bein. Dtsch. Med. Wochenschr. 1992; 117: 541-548.
15. Fortes Z.B., Farsky S.P., Oliveira M.A., Garcia-Leme J. Direct vital microscopic study of defective leukocyte-endothelial interaction in diabetes mellitus. Diabetes 1991; 40: 1267-1273.
16. Jorneskog G., Brismar K., Fagrell B. Skin capillary circulation severely impaired in toes of patients with IDDM, with and without late diabetic complications. Diabetologia 1995; 38: 474-480.
17. Lawall H., Amann B., Rottmann M., Angelkort B. The role of microcirculatory techniques in patients with diabetic foot syndrome. Vasa 2000; 29: 191-207.
18. Corbin D.O., Young R.J., Morrison D.C., Hoskins P., Mc.Dicken W.N., Housley E. Blood flow in the foot, polyneuropathy and foot ulceration in diabetes mellitus. Diabetologia 1987; 30: 468-473.
19. Kitabchi A.E. Proinsulin and C-peptide: a review. Metabolism 1977; 26 :547-587.
20. Wahren J., Ekberg K., Johansson J., Henriksson M., Pramanik A., Johansson B.L. Role of C-peptide in human physiology. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2000. May; 278: 759-768.
21. Ido Y., Vindigni A., Chang K., Stramm L., Chance R., Heath W.F. Prevention of vascular and neural dysfunction in diabetic rats by C-peptide. Science 1997; 277: 563-656.
22. Johansson B.L., Linde B., Wahren J. Effects of C-peptide on blood flow, capillary diffusion capacity and glucose utilization in the exercising forearm of type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. Diabetologia 1992; 35: 1151-1158.
23. Wahren J., Johansson B.L., Wallberg-Henriksson H. Does C-peptide have a physiological role? Diabetologia 1994; 37 Suppl 2: 99-107.

24. Johansson B.L., Borg K., Fernqvist-Forbes E., Odergren T., Remahl S., Wahren J. C-peptide improves autonomic nerve function in IDDM patients. *Diabetologia* 1996; 39: 687-695.
25. Forst T., Kunt T., Pohlmann T., Goitom K., Lobig M., Engelbach M., Beyer J., Pfutzner A. Microvascular skin blood flow following the ingestion of 75 g glucose in healthy individuals. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 1998; 106: 454-459.
26. Harper M.E., Ullrich A., Saunders G.F. Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11. *Proc. Natl.Acad. Sci. U.S.A* 1981; 78: 4458-4460.
27. Bell G.I., Pictet R.L., Rutter W.J., Cordell B., Tischer E., Goodman H.M. Sequence of the human insulin gene. *Nature* 1980; 284: 26-32.
28. Steiner D.F. On the role of the proinsulin C-peptide. *Diabetes* 1978; 27 Suppl 1: 145-148.
29. Michael J., Carroll R., Swift H.H., Steiner D.F. Studies on the molecular organization of rat insulin secretory granules. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 16531-15535.
30. Horwitz D.L., Starr J.I., Mako M.E., Blackard W.G., Rubenstein A.H. Proinsulin, insulin, and C-peptide concentrations in human portal and peripheral blood. *J. Clin. Invest.* 1975; 55: 1278-11283.
31. Sjöberg S., Johansson B.L., Ostman J., Wahren J. Renal and splanchnic exchange of human biosynthetic C-peptide in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1991; 34: 423-428.
32. King G.L., Kunisaki M., Nishio Y., Inoguchi T., Shiba T., Xia P. Biochemical and molecular mechanisms in the development of diabetic vascular complications. *Diabetes* 1996; 45 Suppl 3: 105-108.
33. King G.L., Brownlee M. The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* 1996; 25: 255-270.

34. Kobbah A.M., Ewald U., Tuvemo T. Impaired vascular reactivity during the first two years of diabetes mellitus after initial restoration. *Diabetes. Res.* 1988; 8: 101-109.
35. Kernell A., Ludvigsson J., Finnstrom K. Vitreous fluorophotometry in juvenile diabetics with and without retinopathy in relation to metabolic control: insulin antibodies and C-peptide levels. *Acta. Ophthalmol. (Copenh)* 1990; 68: 415-420.
36. Wahren J., Johansson B.L. New aspects of C-peptide physiology. *Horm. Metab. Res.* 1998; 30: 2-5.
37. Toyota T., Abe K., Kudo M., Kimura K., Goto Y. Inhibitory effects of synthetic rat C-peptide 1 on insulin secretion in the isolated perfused rat pancreas. *Tohoku J. Exp. Med.* 1975; 117: 79-83.
38. Wojciechowski Z., Pershing L.K., Huether S., Leonard L., Burton S.A., Higuchi W.I. An experimental skin sandwich flap on an independent vascular supply for the study of percutaneous absorption. *J. Invest. Dermatol.* 1987; 88: 439-446.
39. Li L., Oshida Y., Kusunoki M., Yamanouchi K., Johansson B.L., Wahren J., Sato Y. Rat C peptide I and II stimulate glucose utilization in STZ-induced diabetic rats. *Diabetologia* 1999; 42: 958-964.
40. Johansson B.L., Sjöberg S., Wahren J. The influence of human C-peptide on renal function and glucose utilization in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 1992; 35: 121-128.
41. Johansson B.L., Kernell A., Sjöberg S., Wahren J. Influence of combined C-peptide and insulin administration on renal function and metabolic control in diabetes type I. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1993;77: 976-981.
42. Johansson B.L., Borg K., Fernqvist-Forbes E., Kernell A., Odergren T., Wahren J. Beneficial effects of C-peptide on incipient nephropathy and neuropathy in patients with type I diabetes mellitus. *Diabet. Med.* 2000. Mar.; 17: 181-189.

43. Fagrell B., Intaglietta M. Microcirculation: its significance in clinical and molecular medicine. *J. Intern. Med.* 1997; 241: 349-362.
44. Thomas, P. K. *Diabetic Neuropathy: Epidemiology and Pathogenesis*. 2. 1991. Oxford Press.
45. Johansson B.L., Borg K., Fernqvist-Forbes E., Odergren T., Remahl S., Wahren J. C-peptide improves autonomic nerve function in IDDM patients. *Diabetologia* 1996; 39: 687-695.
46. Forst T., Kunt T., Pohlmann T., Goitom K., Engelbach M., Beyer J. Biological activity of C-peptide on the skin microcirculation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 1998; 101: 2036-2041.
47. Flatt P.R., Swanston-Flatt S.K., Hampton S.M., Bailey C.J., Marks V. Specific binding of the C-peptide of proinsulin to cultured B-cells from a transplantable rat islet cell tumor. *Biosci. Rep.* 1986; 6: 193-209.
48. Kjeldsen K., Braendgaard H., Sidenius P., Larsen J.S., Norgaard A. Diabetes decreases Na⁺-K⁺ pump concentration in skeletal muscles, heart ventricular muscle, and peripheral nerves of rat. *Diabetes* 1987; 36: 842-848.
49. Nishida K., Ohara T., Johnson J., Wallner J.S., Wilk J., Sherman N. Na⁺/K⁺-ATPase activity and its alpha II subunit gene expression in rat skeletal muscle: influence of diabetes, fasting, and refeeding. *Metabolism* 1992; 41: 56-63.
50. Wald H., Scherzer P., Rasch R., Popovtzer M.M. Renal tubular Na⁺(+)-K⁺-ATPase in diabetes mellitus: relationship to metabolic abnormality. *Am. J. Physiol* 1993; 265: 96-101.
51. Ohtomo Y., Aperia A., Sahlgren B., Johansson B.L., Wahren J. C-peptide stimulates rat renal tubular Na⁺, K⁺-ATPase activity in synergism with neuropeptide Y. *Diabetologia* 1996; 39: 199-205.
52. Barker J.H., Hammersen F., Bondar I., Uhl E., Galla T.J., Menger M.D., Messmer K. The hairless mouse ear for in vivo studies of skin microcirculation. *Plast. Reconstr. Surg.* 1989; 83: 948-959.

53. Eriksson E., Boykin J.V., Pittman R.N. Method for in vivo microscopy of the cutaneous microcirculation of the hairless mouse ear. *Microvasc. Res.* 1980; 19: 374-379.
54. Barker J.H., Hammersen F., Bondar I., Galla T.J., Menger M.D., Gross W., Messmer K. Direct monitoring of nutritive blood flow in a failing skin flap: the hairless mouse ear skin-flap model. *Plast. Reconstr. Surg.* 1989; 84: 303-313.
55. Kolb H. Mouse models of insulin dependent diabetes: low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes Metab. Rev.* 1987; 3: 751-778.
56. Mathe D. Dyslipidemia and diabetes: animal models. *Diabetes. Metab.* 1995; 21: 106-111.
57. Wilson G.L. Streptozotocin interactions with pancreatic beta cells and the induction of insulin-dependent diabetes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1990; 156: 27-54.
58. Masuda M., Murakami T., Egawa H., Murata K. Decreased fluidity of polymorphonuclear leukocyte membrane in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 1990; 39: 466-470.
59. Gerasimidi-Vazeou A., Dionne K., Gentile F., Hazlett T., Lysaght M., Hegre O. Reversal of streptozotocin diabetes in nonimmunosuppressed mice with immunoisolated xenogeneic rat islets. *Transplant. Proc.* 1992; 24: 667-668.
60. Wellhausen S.R. Definition of streptozocin toxicity for primary lymphoid tissues. *Diabetes* 1986; 35: 1404-1411.
61. Kamler M., Lehr H.A., Barker J.H., Saetzler R.K., Galla T.J., Messmer K. Impact of ischemia on tissue oxygenation and wound healing: intravital microscopic studies on the hairless mouse ear model. *Eur. Surg. Res.* 1993; 25: 30-37.

62. Uhl E., Sirsjö A., Haapaniemi T., Nilsson G., Nylander G. Hyperbaric oxygen improves wound healing in normal and ischemic skin tissue. *Plast. Reconstr. Surg.* 1994; 93: 835-841.
63. Mayrovitz H.N. Leukocyte rolling: a prominent feature of venules in intact skin of anesthetized hairless mice. *Am. J. Physiol.* 1992; 262: 157-161.
64. Langer S., Harris A., Biberthaler P., von Dobschuetz E., Messmer K. Orthogonal Polarization Spectral Imaging as a tool for the assesement of hepatic microcirculation. *Transplantation* 2001; 71: 1249-1256.
65. Nolte D., Zeintl H., Steinbauer M., Pickelmann S., Messmer K. Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 1995,15: 244-249.
66. Klyszcz T., Jünger M., Jung F., Zeintl H. Cap Image--ein neuartiges computerunterstütztes Videobildanalysesystem für die dynamische Kapillarmikroskopie. *Biomed. Tech. (Berl.)* 1997; 42: 168-175.
67. Zeintl H., Sack F.U., Intaglietta M., Messmer K. Computer assisted leukocyte adhesion measurement in intravital microscopy. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 1989, 8: 293-302.
68. Biberthaler P., Langer S., Luchting B., Khandoga A., Messmer K. In vivo assessment of colon microcirculation: comparison of the new OPS imaging technique with intravital microscopy. *Eur. J. Med. Res.* 2001; 6: 525-534.
69. Nolte D., Schmid P., Jäger U., Botzlar A., Roesken F., Hecht R., Uhl E., Messmer K., Vestweber D. Leukocyte rolling in venules of striated muscle and skin is mediated by P-selectin, not by L-selectin. *Am. J. Physiol.* 1994; 267: 1637-1642.
70. Terajima H., Enders G., Thiaener A., Hammer C., Kondo T., Thiery J. Impact of hyperthermic preconditioning on postischemic hepatic microcirculatory disturbances in an isolated perfusion model of the rat liver. *Hepatology* 2000. Feb.; 31: 407-415.

71. Harris A.G., Leiderer R., Peer F., Messmer K. Skeletal muscle microvascular and tissue injury after varying durations of ischemia. *Am. J. Physiol.* 1996; 271: 2388-2398.
72. Wahren J., Johansson B.L., Wallberg-Henriksson H., Linde B., Fernqvist-Forbes E., Zierath J.R. C-peptide revisited-new physiological effects and therapeutic implications. *J. Intern. Med.* 1996; 240: 115-124.
73. Zierath J.R., Handberg A., Tally M., Wallberg- Henriksson H. C-Peptide stimulates glucose transport in isolated human skeletal muscle independent of insulin receptor and tyrosine kinase activation. *Diabetologia* 1996; 39: 306-313.
74. Lindstrom K., Johansson C., Johansson E., Harroldsson B. Acute effects of C-Peptide on the microvasculature of isolated perfused skeletal muscle and kidneys in rat. *Acta.Physiol.Scand* 1996; 156: 19-25.
75. Sjöberg S., Johansson B.L., Ostman J., Wahren J. Renal and splanchnic exchange of human biosynthetic C-peptide in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1991; 34: 423-428.
76. Sjoquist M., Huang W., Johansson B.L. Effects of C-peptide on renal function at the early stage of experimental diabetes. *Kidney Int.* 1998; 54: 758-764.
77. Forst T., De La Tour D.D., Kunt T., Pfutzner A., Goitom K., Pohlmann T. et al. Effects of proinsulin C-peptide on nitric oxide, microvascular blood flow and erythrocyte Na⁺,K⁺-ATPase activity in diabetes mellitus type I. *Clin. Sci. (Colch.)* 2000.Mar.; 98: 283.-290.
78. Forst T., Kunt T., Pfutzner A., Beyer J., Wahren J. New aspects on biological activity of C-peptide in IDDM patients. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 1998; 106: 270-276.
79. Algire G.H. An adaption of the transparent- chamber technique to the mouse. *J. Natl. Cancer. Inst.* 1943; 4: 1-11.

80. Knighton D.R., Silver I.A., Hunt T. K. Regulation of wound healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentrations. *Surgery* 1981; 90: 262-270.
81. Nicoll P.A., Webb R.L., Blood circulation in the subcutaneous tissue of the living bat's wing. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1946; 46: 697-711.
82. Sandison J.C. A new method for the study of living growing tissues by the introduction of a transparent chamber in the rabbit's ear. *Anat. Rec.* 1924; 28: 281-287.
83. Barker J.H., Hammersen F., Galla T.J., Bondar I., Zeller P., Menger M.D., Messmer K. Direct monitoring of capillary perfusion following normovolemic hemodilution in an experimental skin-flap model. *Plast. Reconstr. Surg.* 1990; 86: 946-954.
84. Endrich B., Asaishi K., Götz A., Messmer K. Technical report-a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res. Exp. Med. (Berl.)* 1980; 177: 125-134.
85. Barker J.H., Frank J., Bidiwala S.B., Stengel C.K., Carroll S.M., Carroll C.M. An animal model to study microcirculatory changes associated with vascular delay. *Br. J. Plast. Surg.* 1999; 52: 133-142.
86. Chvapil M., Gaines J.A., Chvapil T.A., Benson D., Tellez C. An optimal morphometric method for quantitating wound epithelization. *J. Surg. Res.* 1988; 44: 266-276.
87. Gowland Hopkins N.F., Jamieson C.W. Antibiotic concentration in exudate in venous ulcers: the prediction of ulcer healing rate. *Brit. J. Surg.* 1983; 70: 532-534.
88. Myers B., Donovan W. An evaluation of eight methods of using fluorescein to predict the viability of skin flaps in the pig. *Plast. Reconstr. Surg.* 1985; 75: 245-250.

89. Wilson G.L. Streptozotocin interactions with pancreatic beta cells and the induction of insulin-dependent diabetes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1990; 156: 27-54.
90. Kunt T., Schneider S., Pfutzner A., Goitum K., Engelbach M., Schauf B. The effect of human proinsulin C-peptide on erythrocyte deformability in patients with Type I diabetes mellitus. *Diabetologia* 1999; 42: 465-471.
91. Bonser A.M., Garcia-Webb P. C-peptide measurement and its clinical usefulness: a review. *Ann. Clin. Biochem.* 1981; 18: 200-206.
92. Jorneskog G., Brismar K., Fagrell B. Low molecular weight heparin seems to improve local capillary circulation and healing of chronic foot ulcers in diabetic patients. *Vasa.* 1993; 22: 137-142.
93. Bessman A.N., Sapico F.L. Infections in the diabetic patient: the role of immune dysfunction and pathogen virulence factors. *J. Diabetes Complications* 1992; 6: 258-262.
94. Kunt T., Forst T., Beyer J., Wahren J. The physiological impact of proinsulin C-peptide. *Pathophysiology* 1999; 5: 257-262.
95. Fagrell B., Jorneskog G., Intaglietta M. Disturbed microvascular reactivity and shunting-a major cause for diabetic complications. *Vasc. Med.* 1999; 4: 125-127.

7 LEBENS LAUF

Geburtsdatum 29. März 1976

Geburtsort Bad Homburg v. d. H.

Ausbildung

1986-1992 Kaiserin - Friedrich - Schule,
Humanistisches Gymnasium, Bad Homburg

1992-1993 Miss Porters School, Farmington, Connecticut, USA

1993-1995 Kaiserin-Friedrich-Schule

1994 University of California at Berkeley, USA

Juni 1995 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Hochschulausbildung

Seit 1995 Studentin der Humanmedizin
Ludwig-Maximilians Universität, München

April 2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Dissertation

Seit Mai 1999 Doktorarbeit am Institut für Chirurgische Forschung
Ludwig-Maximilians-Universität München,
Klinikum Großhadern
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. K. Meßmer

Praktisches Jahr

April - Aug. 2001	Innere Medizin Krankenhaus München Schwabing
Aug. - Nov. 2001	Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, und Ohrenkranke, Klinikum Großhadern
Dez. 2001 - März 2002	Chirurgie Universitätsklinik Kapstadt, Südafrika
seit Juni 2002	ÄiP an der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke, Klinikum Großhadern

8 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. mult. h.c. K. Meßmer danke ich für die freundliche Aufnahme in sein Institut und die Überlassung des Dissertationsthemas. Aufgrund seiner Förderung und vertrauensvollen Unterstützung war es mir möglich, nicht nur diese Arbeit durchzuführen, sondern auch einen Einblick in die experimentelle Chirurgie zu gewinnen und Teile dieser Arbeit zu veröffentlichen.

Ich danke Herrn Dr. med. S. Langer für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten sowie für die Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Priv. Doz. Dr. med. E. Uhl danke ich für die Einweisung in das Wundmodell der haarlosen Maus.

Mein herzlicher Dank gilt auch allen übrigen Mitarbeitern des Institutes, für die Aufzucht und Pflege der Tiere und die freundliche Unterstützung während der gesamten Dauer der Arbeit.